

Université de Sherbrooke

**Validation de sondes fluorescentes ciblant l'apoptose pour l'imagerie
pulmonaire par microendoscopie confocale**

Par
Gabriel Paré
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2019

Membres du jury d'évaluation
Pr Olivier Lesur, programme de physiologie
Pr Martin Lepage, programme des sciences des radiations et imagerie biomédicale
Pr Jean-Paul Praud, programme de physiologie
Pr Jean-Bernard Denault, programme de pharmacologie

© Gabriel Paré, 2019

*Je tiens à remercier mon comité d'encadrement : Pr Olivier Lesur, Pr Martin Lepage
et Pr Jean-Bernard Denault ainsi qu'aux étudiants et assistant de recherche :
Frédéric Chagnon, Alexandre Desroches, Marianne Bilodeau-Laforêt et Cyrielle Martini
pour leur encadrement et leurs précieux conseils.*

*Merci au Pr Jean-Paul Praud d'avoir accepté de faire partie du comité de jury
d'évaluation de ce mémoire.*

*Merci aux professeurs Robert Bartha et Robert Hudson du Western University, London,
Ontario, pour leur collaboration et leur contribution au projet.*

*Un remerciement à Éric Marsault et Marc-André Bonin pour leur expertise en chimie qui a
été indispensable à la réalisation de ce projet.*

*Un remerciement spécial à Réjean Lebel pour son support moral, son humour, sa franchise
et sa disponibilité ainsi que son aide précieuse pour la rédaction de ce mémoire.
J'ai été chanceux de collaborer avec toi !*

*Mes amis qui chacun d'entre eux sans exception, étaient là pour moi, m'ont maintenu dans
mes hauts et m'ont aider à me relever dans mes bas.*

*Mon frère Marc-André, mes sœurs Darquise et René-Ann, ainsi que tout le reste de ma
famille qui n'ont jamais cessé de croire en moi et qui m'ont toujours encouragé.
Je vous aime très fort !*

*Finalement, un merci spécial à mes parents pour toute leur aide, leur
appui et leur l'amour qu'ils m'ont donné au long de mes études.
Je vous serai éternellement reconnaissant.*

Merci à tous !

« La véritable science enseigne, par-dessus tout, à douter et à être ignorant. »

Miguel de Unamuno

RÉSUMÉ

Validation de sondes fluorescentes ciblant l'apoptose pour l'imagerie pulmonaire par microendoscopie confocale

Par
Gabriel Paré
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Introduction : La biopsie pulmonaire demeure la méthode optimale pour établir le diagnostic d'une atteinte pulmonaire qui oriente la prise en charge du patient. Cette opération invasive peut occasionner d'importants effets secondaires et sollicite du temps et des ressources importantes. La microendoscopie confocale par fluorescence (MECF) combinée avec des sondes(s) fluorescente(s) pourrait pallier ces inconvénients en permettant d'imager les tissus à l'échelle cellulaire et de discriminer une ou plusieurs activités biochimiques pertinentes. **Objectif final :** Valider *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* des sondes fluorescentes expérimentales (KcapQ, KcapQ^{2gen} et Cy5-London) qui ciblent l'activité de la caspase 3 pour imager l'apoptose dans un contexte de syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) et de cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC). **Méthodes :** *In vitro* : Les sondes ont été incubées avec différentes caspases recombinantes et la vitesse initiale de clivage, v_0 , a été calculée. *In cellulo* : Les lignées H1299 et A549 (lignées épithéliales respiratoires cancéreuses de type adénocarcinome) traitées à la staurosporine (STS), un inhibiteur des kinases qui est un inducteur d'apoptose caspase 3 dépendante, et au Z-VAD-(OMe)-FMK, un inhibiteur de caspase, ont été utilisées comme modèles cellulaires apoptotiques. L'activité de la caspase a été mesurée par FACS et visualisée par microscopie chez ce modèle. *In vivo* : L'imagerie par MECF a été réalisée chez le rat dans deux modèles : CPNPC traités au cisplatine et chez un modèle d'inflammation exposé au lipopolysaccharide (LPS). Le succès de l'implantation des cellules pour les modèles CPNPC (A549-GFP et H1299-GFP) a été validé *ex vivo* et par tomodensitométrie (TDM). **Résultats :** *In vitro*, les sondes sont clivées préférentiellement par caspase 3. Les méthodes de détection des fragments de la sonde Cy5-London ne permettent pas d'obtenir des résultats reproductibles. *In cellulo* : Le modèle cellulaire apoptotique est au point. Les sondes ne permettent pas de différencier les cellules apoptotiques des cellules saines. Les analyses *ex vivo* et les images TDM montrent une implantation réussie des cellules A549-GFP, mais pas des H1299-GFP. **Conclusion :** La méthodologie *in vitro* et *in cellulo* est au point. *In vivo*, les travaux sont en cours au niveau de l'élaboration du modèle CPNPC. Il est possible d'imager le poumon par voie endoscopique bien que les sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen} ne sont pas de bonnes candidates pour l'imagerie de l'apoptose par MECF.

Mots clés : microendoscopie confocale, apoptose, caspase 3, cancer pulmonaire non à petites cellules, syndrome de détresse respiratoire aigüe

SUMMARY

Characterization of fluorescent probes for lung imaging of apoptosis by confocal laser endomicroscopy

By
Gabriel Paré
Physiology Program

Thesis presented at the Faculty of Medicine and Health Sciences for the obtention of Master degree diploma maitre ès sciences (M.Sc.) in Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Introduction: Open lung biopsy is currently the gold standard for the diagnosis of lung injuries and consequently the guidance of patient care. However, it is an invasive procedure that can lead to important side effects and requires the use of valuable time and resources. Confocal laser endomicroscopy (CLE) combined with smart probes could be an alternative to lung biopsies. It would allow physicians to acquire accurate and real-time cellular/molecular data on underlying causes and disease progression. **Final goal:** To validate *in vitro*, *in cellulo* and *in vivo* caspase 3 smart probes (Cy5-London, KcapQ, KcapQ^{2gen}) for imaging of apoptosis in the lung by CLE in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and non-small cell lung cancer (NSCLC). **Method:** *In vitro*: the probes were incubated with different recombinant caspases and the initial activation rate, v_0 , was calculated. *In cellulo*: NSCLC cell lines H1299 and A549 (cancerous respiratory epithelial adenocarcinoma cells) treated with staurosporine (STS), a non specific kinases inhibitor that induces caspase 3-dependant apoptosis, and then treated with Z-VAD-(OMe)-FMK, a caspase inhibitor, were used as an apoptotic cellular model. The efficiency of the probes was validated by FACS and visualised by microscopy with these models. *In vivo*: CLE imaging was performed in NSCLC (A549 and H1299 xenograft) and lipopolysaccharide (LPS) models. The success of the implantation in the NSCLC models was confirmed *ex vivo* and by CT-SCAN. **Results:** *in vitro*: All probes were cleaved specifically by caspase 3. Detection methods for Cy5-London were not reproducible. *In cellulo*: The cellular apoptotic model was developed. The probes did not detect apoptotic cells. *In vivo*: We successfully implanted A549-GFP cells line in rat lung, but the H1299 cells implantation failed. No specific activation of Cy5-London was detected. **Conclusion:** *In vitro* and *in cellulo* methods are well-established to characterize future probes. Further work remains for the elaboration of the NSCLC model. We were able to perform CLE in live animals. Results showed that Cy5-London, KcapQ and KcapQ^{2gen} appeared unsuitable candidates for lung imaging of apoptosis by CLE.

Keywords : confocal laser endomicroscopy, apoptosis, caspase 3, non small cell lung cancer, acute respiratory distress syndrome

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iv
Summary.....	vi
Table des matières	vii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations	xiii
Introduction.....	1
Mise en contexte.....	1
Physiologie pulmonaire	2
Anatomie pulmonaire et fonctions respiratoires.....	2
Physiopathologies pulmonaires.....	5
Cancer pulmonaire.....	5
Syndrome de détresse respiratoire aigüe	6
Modalités standards de diagnostic clinique.....	8
Imagerie du cancer pulmonaire	8
Imagerie de l'inflammation	10
Défis en clinique.....	10
Imagerie optique	12
La fluorescence.....	13
Le rendement quantique	14
L'atténuation	15
Sources de fluorescence	15
Fluorescence endogène.....	15
Fluorescence exogène.....	16
Applications de l'imagerie optique	17
Imagerie par microendoscopie confocale par fluorescence (MECF)	18
MECF en pneumologie.....	20
Physiologie de la mort cellulaire.....	23
La mort cellulaire non programmée	24
Morts cellulaires programmées	25
L'apoptose	26
Signalisation de l'apoptose.....	26

Les caspases	28
La mort cellulaire en fluorescence	30
L'apoptose visualisée par MECF.....	33
Structure moléculaire des sondes expérimentales.....	35
La MECF : l'imagerie moléculaire au chevet du patient.....	37
Hypothèse/problématique	38
Objectifs	38
Matériel et méthodes	39
Dosage des sondes	39
Expression, purification et caractérisation de la caspase 3 recombinante	40
Expression et purification sur colonne	40
Titration de la caspase 3 recombinante	41
Études <i>in vitro</i>.....	42
Activation des caspases recombinantes	42
Caractérisation de KcapQ et KcapQ ^{2gen}	42
Évaluation de la cinétique enzymatique de Cy5-London.....	43
Chromatographie sur couche mince (CCM).....	43
Essai à la fluorescamine	43
Chromatographie en phase liquide ultra-performance et spectrométrie de masse (UPLC-MS).....	44
Études <i>in cellulo</i>	44
Culture des cellules et induction de l'apoptose	45
Cytométrie en flux (FACS)	45
Essai colorimétrique	47
Microscopie épifluorescence	47
Microscopie confocale	48
Expérimentations <i>in vivo</i>	48
Traitements des animaux.....	48
Modèle inflammatoire	49
Modèle d'implantation orthotopique	49
Imagerie.....	49
Tomodensitométrie.....	49
Microendoscopie confocale par fluorescence (MECF)	50
Analyses statistiques	51
Résultats.....	52
Dosage des sondes	52

Caractérisation de la caspase 3 recombinante	55
Étude <i>in vitro</i>	55
KcapQ et KcapQ ^{2gen}	56
Cy5-London	58
Chromatographie sur couche mince (CCM)	58
Essai à la fluorescamine	61
HPLC-MS	63
Étude <i>in cellulo</i>	66
Validation du modèle apoptotique	66
Dosage de l'activité caspase 3 à l'Ac-DEVD-pNa	66
Cytométrie en flux (FACS)	71
Microscopie à épifluorescence	76
Test des sondes	77
Cytométrie en flux	77
Microscopie à épifluorescence	80
Microscopie confocale	80
Étude <i>in vivo</i>	81
Caractérisation du modèle d'implantation orthotopique	81
MECF <i>in vivo</i>	84
Discussion	86
Les sondes expérimentales	86
Les études <i>in vitro</i>	87
CCM	87
Essais à la fluorescamine	88
HPLC-MS	88
Les études <i>in cellulo</i>	89
Le modèle cellulaire apoptotique	89
Test des sondes expérimentales	91
Les études <i>in vivo</i>	92
Élaboration des modèles	93
L'imagerie par MECF de Cy5-London	94
Conclusion	96
Liste des références	97
Annexes	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du système respiratoire	3
Figure 2 : Représentation d'un lobule pulmonaire	4
Figure 3 : Schéma d'un alvéole	5
Figure 4 : Mécanisme de l'inflammation pulmonaire	8
Figure 5 : Schématisation d'une onde électromagnétique et du déplacement de Stokes	13
Figure 6 : Diagramme de Jablonski	14
Figure 7 : Schéma optique du CellVizio®.....	19
Figure 8 : Publications utilisant le CellVizio®.....	20
Figure 9 : Voies d'activations intrinsèque et extrinsèque de la cascade apoptotique.....	28
Figure 10 : Structure moléculaire des sondes	36
Figure 11 : Mécanisme d'activation des sondes	36
Figure 12 : Spectres d'absorbance des sondes moléculaires	52
Figure 13 : Caractérisation de la caspase 3 recombinante	55
Figure 14 : Activation de KcapQ par les caspases recombinantes	56
Figure 15 : Activation de KcapQ ^{2gen} par la caspase 3.....	57
Figure 16 : Caractérisation du signal de Cy5-London sur CCM	59
Figure 17 : Détection de Cy5-London clivée par différentes caspases par CCM.....	60
Figure 18 : Caractérisation de la méthodologie de l'essai à la fluorescamine.....	61
Figure 19 : Essai à la fluorescamine avec Cy5-London clivée par la caspase 3.....	62
Figure 20 : Essai à la fluorescamine avec Cy5-London clivée par différentes caspases.....	62
Figure 21 : Test de linéarité des signaux UPLC-MS	64
Figure 22 : Détection de Cy5-London par UPLC-MS.....	65
Figure 23 : Activité de la caspase 3 chez les lignées A549 et MCF-7 en fonction de la concentration de STS	67
Figure 24 : Activité de la caspase 3 chez les cellules A549 après une exposition au 5-FU ou aux UV	68
Figure 25 : Activité de la caspase 3 chez la lignée A549-GFP.....	69
Figure 26 : Activité de la caspase 3 chez la lignée HeLa traitée à la STS.....	70

Figure 27 : Activité de la caspase 3 chez les cellules H1299	71
Figure 28 : Détection des cellules H1299 caspase 3 positive par CellEvent™	72
Figure 29 : Détection des cellules H1299 caspase 3 positives par NucView® 488	73
Figure 30 : Potentiel membranaire mitochondrial chez les cellules H1299	75
Figure 31 : Détection des cellules A549 apoptotiques par CellEvent™	76
Figure 32 : Détection des cellules H1299 apoptotiques par CellEvent™	77
Figure 33 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ par FACS.....	78
Figure 34 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ ^{2gen}	79
Figure 35 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec Cy5-London.....	79
Figure 36 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec Cy5-London.....	80
Figure 37 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ par microscopie confocale.....	81
Figure 38 : Comparaison des images TDM d'une implantation réussie et échouée.....	82
Figure 39 : Confirmation du succès de l'implantation <i>ex vivo</i>	83
Figure 40 : Colocalisation du signal de Cy5-London et des cellules A549-GFP <i>in vivo</i>	84
Figure 41 : Internalisation de Cy5-London dans le temps <i>in vivo</i> dans le modèle de rat LPS	85
Figure 42 : Activité de la caspase 3 dans le poumon de différents modèles de rat	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des caspases apoptotiques	30
Tableau 2 : Liste de sondes fluorescentes ciblant la caspase 3	32
Tableau 3 : Sondes apoptotiques appliquées à la MECF en pneumologie	34
Tableau 4 : Dosage de la sonde expérimentale Cy5-London	53
Tableau 5 : Dosage de la sonde expérimentale KcapQ	53
Tableau 6 : Dosage de la sonde expérimentale KcapQ ^{2gen}	54
Tableau 7 : Clivage de KcapQ	56
Tableau 8 : Clivage de KcapQ ^{2gen} par la caspase 3	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta\Psi_m$	Différence de potentiel membranaire mitochondriale
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
φ	Rendement quantique
ACN	Acétonitrile
ASC	Aire sous la courbe
ALK	Kinase des lymphomes anaplasiques, <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
Bcl-2	Protéines de la famille des lymphomes des cellules B 2, <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
Bid	Protéine agoniste de la mort du domaine d'interaction-BH3, <i>BH3 Interaction-domain Death agonist</i>
CCCP	Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone
CPNPC	Cancer pulmonaire non à petites cellules
CPP	Peptide de perméation cellulaire, <i>Cell-Penetrating Peptide</i>
Cyt <i>c</i>	Cytochrome <i>c</i>
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DD	Domaine de la mort, <i>Death Domain</i>
DR	Récepteur de la mort, <i>Death Receptor</i>
DTT	Dithiothréitol
DSAPF	Acide 4-[6-(4-Aminophénoxy)-3-oxo-3H-xanthène-9-yl]benzène-1,3-disulfonique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épithélial, <i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
FISH	Hybridation de la fluorescence in situ, <i>Fluorescence In Situ Hybridation</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate

FPLC	Chromatographie liquide rapide de protéine, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	Transfert d'énergie entre molécules, <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GFP	Protéine fluorescente verte, <i>Green Fluorescent Protein</i>
HER2	Récepteur du facteur de croissance épithélial humain-2, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
IC	Conversion interne, <i>Internal Conversion</i>
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISC	Croisement inter-systèmes, <i>Inter-System Crossing</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MECF	Microendoscopie confocale par fluorescence
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée
NIR	Proche infrarouge, <i>Near Infrared</i>
OCT	Composé de coupe à température optimale, <i>Optimal Cutting Temperature Compound</i>
P	Pression partielle
P _a	Pression partielle artérielle
P _A	Pression partielle alvéolaire
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymérase-1
PS	Phosphatidylsérine
PMN	Neutrophiles polynucléaires, <i>Polymorphonuclear Neutrophils</i>
Q	Atténuateur, <i>Quencher</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène, <i>Reactive Oxygen Species</i>
STS	Staurosporine
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigüe
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TDM	Tomodensitométrie
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale-alpha, <i>Tumour Necrosis Factor-alpha</i>
TP	Température de la pièce
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

TUNEL	Marquage terminal de Nick par la déoxynucléotidyle transférase, <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
UPLC-MS	Chromatographie en phase liquid ultra-performante - spectrométrie de masse, <i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
UV	Ultraviolet
5-FU	5-Fluorouracile
7-AAD	7-aminoactinomycine D

INTRODUCTION

Mise en contexte

La biopsie pulmonaire avec analyse histopathologique reste la méthode optimale pour établir le phénotype d'une atteinte respiratoire et qui va orienter la stratégie thérapeutique du médecin. Pour l'étude du poumon, cette procédure est invasive, coûteuse et un suivi longitudinal s'avère dangereux pour le patient. La raison de l'efficacité de la biopsie est qu'il est possible d'utiliser des marqueurs biochimiques qui vont discriminer une activité biochimique pertinente au diagnostic. Il est donc important de développer une méthode qui permettra d'utiliser ces marqueurs biochimiques de façon répétée, directement et sans le besoin d'une biopsie. L'alternative proposée dans le cadre de ce projet est l'imagerie par microendoscopie confocale par fluorescence (MECF) à l'usage d'une sonde intelligente qui consiste à imager des événements cellulaires ou moléculaires par voie endoscopique tout en ajoutant un contraste spécifique à l'activité biologique d'intérêt : l'apoptose, un type de mort cellulaire programmée.

L'objectif de ce projet est de développer des sondes intelligentes et de les valider avec la MECF. La caractérisation des sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen} feront l'objet de ce mémoire. Elles ciblent l'activité de la caspase 3, une protéase à cystéine dont l'activité est détectable lors de l'apoptose. La caractérisation est réalisée *in vitro* avec des caspases recombinantes et sur des modèles cellulaires et animaux dans lesquels l'activité de la caspase 3 est confirmée.

La première partie de l'introduction présentera la physiologie pulmonaire et décrira deux pathologies, soit le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) et le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) pour enchaîner avec les défis en clinique associés à la prise en charge des patients qui présentent ces pathologies ainsi que les limitations des outils de prise en charge en clinique. La deuxième partie abordera les principes d'imagerie optique et l'état de l'art de l'imagerie par MECF. La troisième partie se concentrera sur la signalisation cellulaire de l'apoptose et les sondes fluorescentes disponibles qui permettent de la détecter.

Physiologie pulmonaire

Le rôle des poumons est d'assurer les échanges gazeux entre les compartiments sanguin et alvéolaire. Pour se faire, le poumon est muni d'une grande surface de contact (150 m²) et d'une grande densité de vaisseaux capillaires (Burri, 1985). Il y a deux circulations, soit la circulation systémique et pulmonaire. La circulation pulmonaire passe par les poumons pour effectuer les échanges gazeux entre le compartiment sanguin et alvéolaire, tandis que la circulation bronchique irrigue le poumon lui-même (Kryger et al., 2017). Cette section décrit l'anatomie et la physiologie pulmonaire, ainsi que les pathologies d'intérêt dans le cadre de ce projet, soient le CPNPC et le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA).

Anatomie pulmonaire et fonctions respiratoires

Les poumons se situent au niveau de la cage thoracique dans la cavité pleurale délimitée par deux plèvres, soient les plèvres viscérale et pariétale. La plèvre viscérale tapisse le poumon et la plèvre pariétale recouvre la paroi thoracique. Les plèvres produisent le liquide pleural qui assure une lubrification de la cavité ainsi qu'une adhésion entre les poumons et la paroi thoracique. Chez l'Homme, le poumon droit est divisé par les cissures oblique et horizontale en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur), tandis que le poumon gauche est divisé par une fissure oblique en deux lobes (supérieur et inférieur). Le lobe supérieur gauche épouse la forme du médiastin, la cavité où se situe le cœur (Marieb et al., 2010).

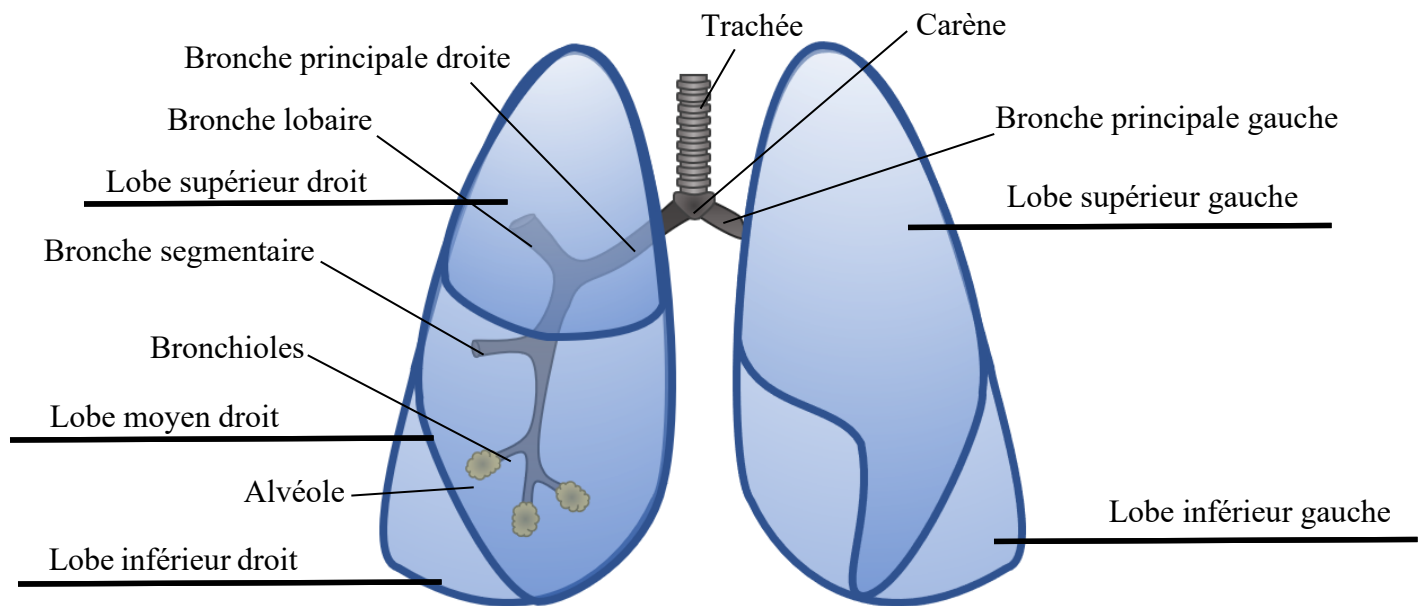


Figure 1 : Schéma du système respiratoire

Le poumon droit est divisé en trois lobes, tandis que le poumon gauche est divisé en deux. La trachée se divise en 2 bronches principales au niveau de la carène afin de se ramifier davantage dans les poumons gauche et droit. Cette ramification permet d'obtenir une grande surface de contact afin de favoriser les échanges gazeux entre les compartiments sanguin et alvéolaire au niveau des alvéoles.

Les voies aériennes se divisent en deux zones fonctionnelles, soient la zone de conduction et la zone respiratoire. La zone de conduction contribue à conduire, purifier, humidifier et réchauffer l'air inspiré. Celle-ci comprend plusieurs structures telles que la *cavité nasale*, le *pharynx*, le *larynx* puis la *trachée* qui se sépare en deux au niveau de la carène formant les *bronches principales* (Barrow et al., 2017). Ces bronches se ramifient davantage en conduits ayant un diamètre de plus en plus petit, appelés les *bronches lobaires* (secondaires), puis *segmentaires* (tertiaires). Ces bronches segmentaires se ramifient davantage pour donner les *bronchioles terminales*, d'un diamètre d'environ 0,4 mm chez l'Homme. Les bronchioles terminales se ramifient davantage, ce qui marque le début de la zone respiratoire. Cette zone est composée de canaux appelés *bronchioles respiratoires* qui se ramifient pour donner les *canaux alvéolaires* qui donne accès aux *alvéoles*. Les alvéoles ont un diamètre moyen de 0,2 mm variant entre 0,1 mm à l'expiration et 0,3 mm à l'inspiration. Ce diamètre est deux fois plus petit chez le rat (Miller et al., 1993).

La circulation des gaz dans les voies aériennes, appelée ventilation, est possible grâce à une différence de pression des gaz dans les poumons par rapport à la pression atmosphérique. Cette différence est causée par le mouvement de la paroi thoracique qui induit des variations de volume pulmonaire (Marieb et al., 2010). Les principaux muscles responsables de ce mouvement sont le diaphragme, qui se situe à la base des poumons, et les muscles intercostaux localisés au niveau de la cage thoracique, entre les côtes (Murray, 1986). Les lobules pulmonaires sont composés de bronchioles terminales et de bronchioles respiratoires, ces derniers qui sont connectés aux alvéoles par le biais des canaux alvéolaires. Les alvéoles ont un diamètre moyen de 0,2 mm (Burri, 1985; Lumb, 2017). Ces alvéoles ont un épithélium spécialisé qui permet d'accomplir son rôle, qui est d'assurer les échanges gazeux entre le compartiment alvéolaire et sanguin (Marieb et al., 2010). La surface de l'épithélium pulmonaire est occupée à 95 % de pneumocytes de type I et à 5 % de pneumocytes de type II (Papadakos et al., 2008). Les pneumocytes de type I, squameux et allongés, assurent les échanges gazeux (Barrow et al., 2017). Les pneumocytes de type II, de forme cubique, jouent un rôle dans l'immunité innée, dans la réparation alvéolaire et dans la synthèse et sécrétion du surfactant (Rozycki et al., 2017). Les alvéoles logent aussi des macrophages résidents qui amorcent et modulent la réponse inflammatoire contre des corps étrangers (Crapo et al., 1982; Hussell et al., 2014).

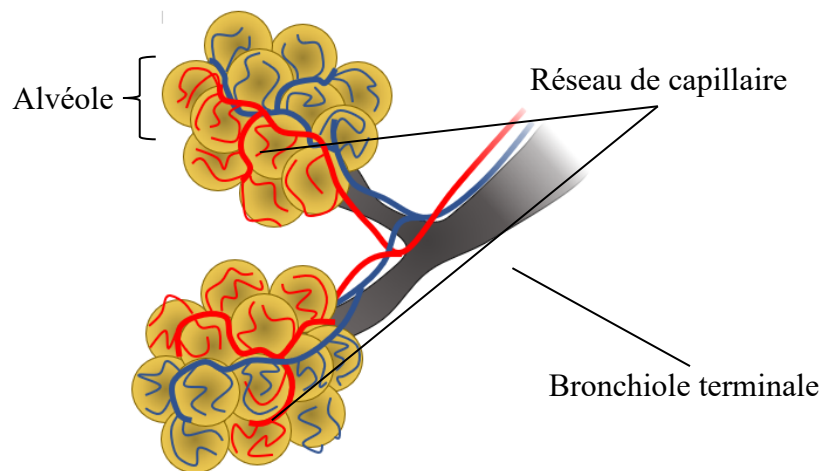


Figure 2 : Représentation d'un lobule pulmonaire

Les lobules pulmonaires comprennent les bronchioles terminales qui marquent la fin de la zone de conduction. Les bronchioles sont des voies aériennes de très petit diamètre (en moyenne 0,2 mm) qui permettent aux gaz d'atteindre les alvéoles, la zone respiratoire. Les alvéoles sont irriguées par un dense réseau de capillaires, ce qui favorise la diffusion des gaz entre le compartiment alvéolaire et sanguin.

Le rôle du système respiratoire est d'assurer un apport continu en oxygène (O_2), essentiel à la respiration mitochondriale, et l'élimination du gaz carbonique produit (CO_2). Les gaz diffusent entre le compartiment alvéolaire et sanguin selon leur gradient de pression partielle (P) artérielle (P_a) ou alvéolaire (P_A) (Dejours, 1982; Marieb et al., 2010).

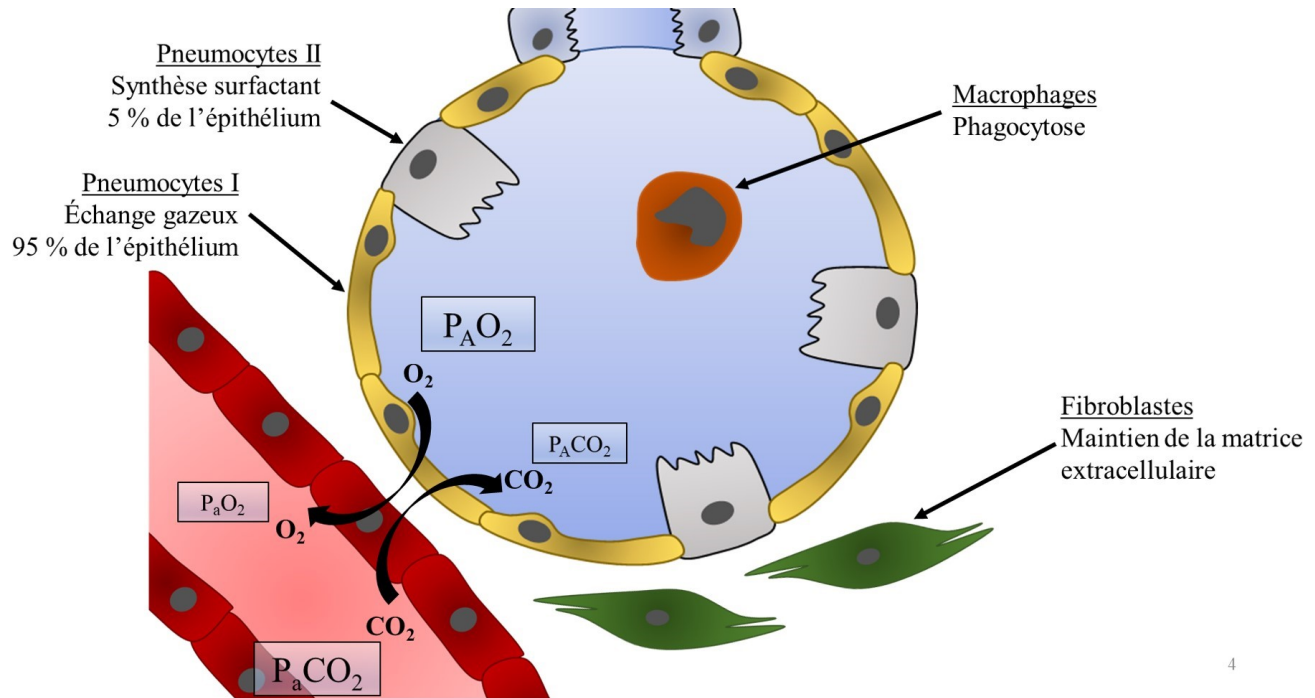


Figure 3 : Schéma d'un alvéole

L'alvéole est une structure composée de plusieurs types cellulaires où se déroulent les échanges gazeux entre les compartiments sanguin et alvéolaire par diffusion selon le gradient de P des gaz. La P_AO_2 étant supérieure à la P_aO_2 , l' O_2 diffuse du compartiment alvéolaire vers les capillaires et inversement, la P_aCO_2 est supérieure à la P_ACO_2 , le CO_2 diffuse donc du compartiment sanguin vers le compartiment alvéolaire où il sera alors éliminé lors de l'expiration.

Physiopathologies pulmonaires

Cancer pulmonaire

Le cancer pulmonaire fut identifié pour la première fois par Laennec en 1815 (Rosenblatt, 1964). Il est le cancer causant le plus de décès avec un taux de survie sur 5 ans de 15,6 % aux États-Unis (Herbst et al., 2008; Dela Cruz et al., 2011). Plusieurs facteurs de risque sont identifiés, tels que l'exposition au tabagisme, à l'amiante, au nickel, aux radiations et à la pollution atmosphérique (Alberg et al., 2013). Le cancer pulmonaire se

divise en deux types, soit le cancer à petites cellules (SCLC), qui représente 15 % des cancers pulmonaires, et le CPNPC qui représente 85 % (Sui et al., 2018).

Le CPNPC se subdivise en deux types, soit l'adénocarcinome et le carcinome squameux (ou épidermoïde). Ce classement est basé sur des spécimens obtenus par biopsies chez des patients en stades avancés. L'adénocarcinome se distingue par la présence de mutation au niveau du gène du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) et du réarrangement du gène codant pour la kinase des lymphomes anaplasiques (ALK), ce qui induit chez les cellules tumorales une activation constitutive des voies mitogéniques d'une résistance à l'apoptose (Travis et al., 2013). Le réarrangement chromosomique du gène *ALK* est présent dans 5 % des adénocarcinomes, surtout chez des sujets plus jeunes et non-fumeurs (Yamamoto et al., 2014). On y retrouve d'autres mutations, entre autres au niveau des gènes *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1*, *MAP2K1* et *MET*. Le carcinome squameux possède sensiblement les mêmes mutations, mais dans des proportions plus faibles (Pao et al., 2011).

La chirurgie est le traitement de première ligne pour traiter le CPNPC, qui consiste soit à retirer la tumeur, à retirer un lobe ou à retirer un poumon au complet (de Hoyos et al., 2014). Les traitements pharmacologiques sont les traitements de seconde ligne. Les agents de chimiothérapies utilisés en première ligne sont les sels de platine (cisplatine ou carboplatine) ainsi que d'autre agent tels que le paclitaxel, docetaxel ou irinotecan (Masters et al., 2015). D'autres agents peuvent être donnés selon le profil de mutation des tumeurs. Par exemple, le crizotinib (un inhibiteur de la protéine ALK) est administré aux patients présentant un réarrangement chromosomique au niveau des gènes codant pour la protéine ALK (Solomon et al., 2014).

Syndrome de détresse respiratoire aigüe

Le SDRA est une condition caractérisée par un état d'hypoxémie causé par la présence d'un œdème pulmonaire d'origine non cardiogénique, d'inflammation, d'hémorragie, d'atélectasie (affaissement des alvéoles) et de mort cellulaire (Umbrello et al., 2016). Cette condition est due à une réaction inflammatoire non contrôlée provoquée par une atteinte pulmonaire sévère directe (p. ex., pneumonie, noyade, inhalation d'agents irritants ou contusion) ou indirecte (p. ex., trauma sévère, transfusions multiples, pancréatite ou sepsis) (Lesur et al., 1999). Le SDRA se déroule en trois phases, soit : 1) la phase exsudative, 2) la phase fibreuse et 3) la phase de résolution. La phase exsudative se distingue par une

infiltration bilatérale de liquide riche en protéines dans les cavités pleurales et par la présence d'un œdème pulmonaire. La phase fibreuse est caractérisée par une exacerbation de l'hypoxémie, la présence de fibrose alvéolaire et une amplification de la réaction inflammatoire. La phase de résolution est caractérisée par un retour en normoxie, une résorption de l'œdème et le retour à une compliance pulmonaire normale (Matthay et al., 2012).

Au niveau cellulaire, l'atteinte provoque un recrutement massif de cellules neutrophiles polynucléaires (PMN) qui jouent un rôle majeur dans un contexte d'inflammation aigüe (Lesur et al., 1999). Ces cellules PMN sont activées par plusieurs médiateurs dérivés de l'acide arachidonique tels que le thromboxane, certaines prostaglandines et les leukotriènes (Levy et al., 2014). Une fois activés, les PMN sécrètent diverses chimiokines visant à maintenir une réaction inflammatoire importante tel que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-1, ou qui visent à détruire l'agent pathogène par le biais d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de protéases (protéinase 3, élastase et cathepsine G) (Nikolaus et al., 1998; Pham, 2008). Ces espèces, ainsi que l'agent pathogène lui-même, peuvent aussi causer un dommage au niveau des pneumocytes et des cellules immunitaires, ce qui peut mener à la mort cellulaire. Le LPS, un ligand du récepteur de type Toll 4 présent sur la membrane externe des bactéries Gram négatives, induit la cascade apoptotique chez les PMN (Sabroe et al., 2003). Les cultures primaires de PMN, de cellules épithéliales et les macrophages de rat obtenus par LBA exposés pendant 24 h au LPS à 20 $\mu\text{g/mL}$ induit l'apoptose (Z'graggen et al., 2010). Il est aussi rapporté que le LPS instillé en intratrachéal chez la souris (5 $\mu\text{g/souris}$, 24 h) induit l'apoptose pulmonaire (Vernooy et al., 2001). La mort des pneumocytes et de l'agent pathogène produit des débris cellulaires qui sont phagocytés par les PMN et les macrophages. Les macrophages sécrètent divers médiateurs anti-inflammatoires tels que le facteur de croissance transformant-bêta, la prostaglandine E₂ et des résolvines qui inhibent l'activité des PMN, ce qui finit par induire la mort par apoptose (Levy et al., 2014). Une mauvaise résolution de l'inflammation provoque une fibrose pulmonaire caractérisée par une perte des pneumocytes de type I, une prolifération des pneumocytes de type II et un recrutement de fibroblastes qui synthétisent une matrice extracellulaire dense et désorganisée (Strieter, 2008).

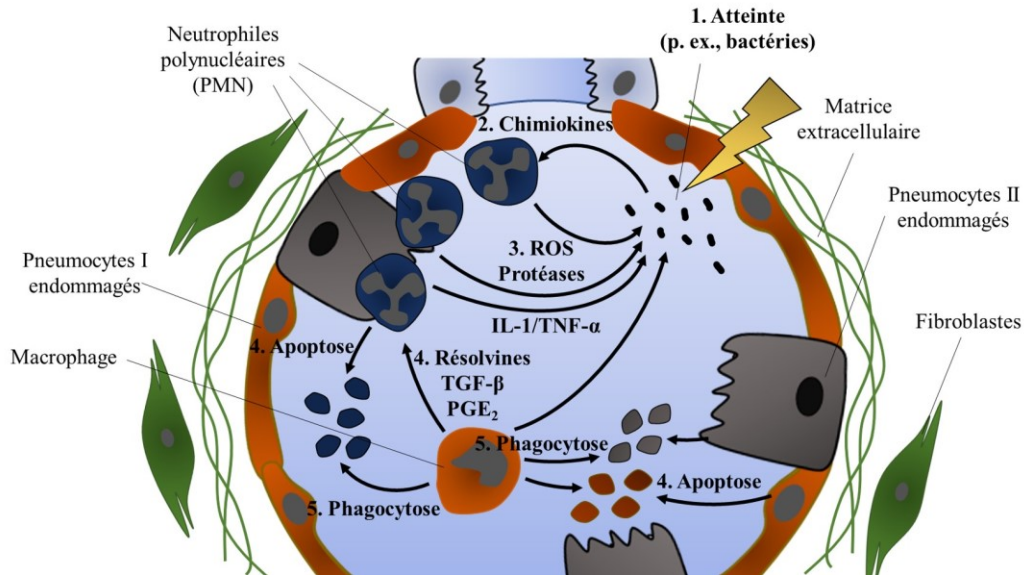


Figure 4 : Mécanisme de l'inflammation pulmonaire

1) Le poumon subit une atteinte, dans ce cas-ci, une infection bactérienne. 2) L'agent pathogène sécrète des chimiokines, ce qui produit un recrutement massif de PMN. 3) Les PMN produisent des ROS, des protéases et des chimiokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF- α) afin de détruire l'agent et maintenir la réaction inflammatoire. Ces chimiokines provoquent aussi des dommages à l'épithélium. 4) Les macrophages sécrètent des facteurs anti-inflammatoires qui induisent l'apoptose chez les PMN. 5) L'agent pathogène éliminé, les corps apoptotiques des PMN et de l'épithélium sont phagocytés, ce qui marque la résolution de la réaction inflammatoire. Si la réaction inflammatoire demeure non résolue, il y aura alors synthèse de matrice extracellulaire dense et désorganisée.

Modalités standards de diagnostic clinique

Le CPNPC et le SDRA sont deux pathologies dont les manifestations cliniques ne permettent pas de situer la cause et d'orienter la prise en charge. Les modalités d'imagerie conventionnelles contribuent à suggérer la présence d'inflammation, de zones de consolidation ou de tumeurs solides sans pouvoir en cibler la cause ou établir le phénotype des tumeurs, c'est-à-dire l'ensemble des caractéristiques des tumeurs. La prochaine section décrit les modalités d'imagerie conventionnelle dans un contexte de cancer pulmonaire et d'inflammation aigüe ainsi que les défis actuels auxquels fait face la clinique.

Imagerie du cancer pulmonaire

La propagation du cancer du poumon se classifie selon les critères TNM, soit la localisation et le volume de la tumeur primitive (T0 à T4), l'envahissement de nodules lymphatiques et la localisation (N1 à N3) ou la présence de métastases intra ou

extrathoraciques (M1a ou M1b) (Purandare, et al., 2015). Cette classification se fait principalement par TDM, par TEP et par IRM.

La TDM est la pierre angulaire pour la localisation de la tumeur primitive *via* la différence entre la densité électronique du poumon sain (majoritairement gazeuse) et celle des tumeurs (del Ciello et al., 2017). La localisation des tumeurs est importante afin de réaliser les biopsies et pour savoir si celle-ci peut être retirée par une chirurgie (Detterbeck, 2018). Bien que la TDM fournisse des images avec une résolution latérale adéquate pour localiser les tumeurs (8 à 10 mm), sa sensibilité ne permet pas toujours de distinguer les tumeurs des zones de consolidation pulmonaire ou d'atélectasie (zones pulmonaires où les alvéoles sont affaissés) (James et al., 2012; Purandare, et al., 2015). De plus, il est impossible d'obtenir des informations fonctionnelles, car la TDM ne permet pas de visualiser des phénomènes biochimiques directement (Lecchi et al., 2007). Pour pallier ces inconvénients, la TDM est couplée à l'imagerie TEP, qui forme des images *via* la détection simultanée de photons d'annihilation de 511 keV provenant de la désintégration d'un positron émis par un radio-isotope préalablement administré (Phelps, 2000). Par exemple, le ^{18}F -FDG est largement utilisé pour détecter et quantifier le nombre de métastases (descripteur N).

Le descripteur N est un indice pour le pronostic et oriente la prise de décision sur la stratégie thérapeutique à emprunter, cette classification dépend des ganglions lymphatiques envahis (Goldstraw et al., 2007). Le ^{18}F -FDG détecte la captation du glucose qui est augmenté par le besoin métabolique de la croissance tumorale. La TEP permet l'obtention d'un classement N avec une précision de 91 % (une faible variation des mesures), une spécificité de 79 % (les chances d'obtenir un résultat négatif chez un patient sain) et une sensibilité de 96 % (les chances d'obtenir un résultat positif chez un patient malade) (Vansteenkiste et al., 2001).

Finalement, le descripteur M permet de classer les cancers métastatiques, ce qui représente plus de la moitié des cancers pulmonaires. Les classes M1a et M1b correspondent respectivement à l'apparition de métastases intra et extra thoraciques. Les sites extrathoraciques principaux sont les glandes surrénales, les os, le foie et le cerveau (Popper, 2016). La TDM n'est pas optimale pour imager le cerveau à cause de la faible différence de densité électronique entre les tumeurs et le parenchyme (Purandare, et al., 2015). La résolution (< 1 mm) et le contraste obtenus par IRM sont mieux adaptés pour l'imagerie

cérébrale (McCann et al., 2011; James et al., 2012). L'IRM du poumon demeure une modalité alternative en pneumologie dans les cas où les rayons ionisants doivent être strictement évités, ce qui peut arriver par exemple chez les enfants, les femmes enceintes ou les cas qui nécessitent des examens prolongés par imagerie (Biederer et al., 2012).

Imagerie de l'inflammation

La TDM est la principale modalité d'imagerie pour suivre le degré de recrutement de cellules inflammatoires au poumon d'un patient ventilé sous pression expiratoire positive. Dans un contexte de SDRA, l'imagerie par rayon X et la TDM demeurent les méthodes privilégiées, car elles permettent d'imager une infiltration bilatérale des alvéoles, qui est la principale manifestation d'un SDRA (Scherer et al., 2016). Dans la phase aiguë (les 48 premières heures), les images de TDM présentent des zones blanches et opaques. Dans la phase intermédiaire (1 à 2 semaines plus tard), il y a apparition de zones de consolidation (zone pulmonaire non compressible) et une infiltration diffuse qui persiste. L'inflammation peut se résoudre d'elle-même ou par le biais d'une intervention pharmacologique, mais peut amorcer un processus de fibrose lorsqu'elle est non résolue. Sur la TDM, la présence de structures en nid d'abeille est un profil de sémiologie radiologique le plus souvent associé à la fibrose (Ball et al., 2017). L'application de la TEP par le ^{18}F -FDG permet d'imager le recrutement des PMN caractéristique d'un SDRA. Ces images montrent un recrutement de PMN dans des zones autres que les zones de consolidation, ce qui permet de détecter un SDRA précoce ou de distinguer les patients à risque de SDRA (de Prost et al., 2010).

Défis en clinique

Du côté de l'imagerie, les rayons X et la TEP permettent de détecter des zones d'inflammation, des lésions périphériques ou des nodules pulmonaires, mais doivent être combinés à une biopsie afin d'établir le statut du tissu et poser un diagnostic pour orienter la prise en charge (Asano et al., 2017). La TEP est sensible, quantifiable et une grande variété de radiotraceurs sont disponibles permettant de discriminer des événements biochimiques. Cependant, la TEP possède une faible résolution spatiale et certains isotopes utilisés ont un temps de demi-vie court, ce qui implique qu'un cyclotron à proximité doit être disponible pour limiter au maximum le délai entre sa production et son utilisation (Molavipordanjani et al., 2018). Mis à part l'imagerie, le lavage broncho-alvéolaire demeure le standard clinique

pour le diagnostic d'une pneumonie infectieuse, d'établir le profil cytologique différentiel de contenu cellulaire broncho ou broncho-alvéolaire qui peut aider à caractériser et évaluer le processus d'atteinte pulmonaire et de réparation de l'organe. Cependant, les échantillons peuvent être contaminés par les sécrétions oropharyngées et la culture du fluide bronchoalvéolaire prend plus de 48 heures (Baselski et al., 1994).

La biopsie pulmonaire est le meilleur outil pour poser un diagnostic et orienter la prise en charge (Georgiadou et al., 2013). Cette procédure consiste à prélever un échantillon afin d'observer la structure du tissu ou d'établir le profil moléculaire par le biais de marqueurs biochimiques. Les marqueurs biochimiques, aussi appelés biomarqueurs, sont des caractéristiques spécifiques mesurables et attribuables à une activité biologique.

Dans un contexte de cancer pulmonaire, il est possible de prélever par une biopsie endoscopique ou transthoracique, d'établir un phénotypage des tumeurs afin d'évaluer leur susceptibilité aux agents de chimiothérapie (Cheng et al., 2012). Cependant, ce phénotypage requiert un prélèvement, et comme la quantité de matériel doit être faible afin de réduire les risques, cette dernière est souvent insuffisante pour effectuer tous les tests nécessaires (Papazian et al., 1998; Moreira et al., 2012).

La biopsie chirurgicale ouverte est utilisée dans un contexte d'inflammation. Une méta-analyse de 1994 à 2013 représentant 513 patients sous ventilation mécanique montre que la biopsie chirurgicale ouverte a permis une réorientation de la stratégie thérapeutique dans 78 % des cas et la cessation de la thérapie dans 10 % (Wong et al., 2015). Une autre étude démontre que, dans un contexte d'inflammation pulmonaire, la biopsie ouverte permet une réorientation de la prise en charge des patients dans 73 % des cas ou la cessation d'un traitement inapproprié dans 37 % des cas (Aublanc et al., 2017). Un marqueur déterminant pour poser un diagnostic est la détection de dommages alvéolaires diffus en histologie qui permet de distinguer la phase exsudative, proliférative, résolutive ou fibrotique selon l'aspect du tissu (Tomashefski, 2000). Puisque la biopsie chirurgicale ouverte est une procédure invasive qui nécessite plusieurs étapes, l'état du patient peut se détériorer, surtout si l'on considère qu'en condition de SDRA le faible apport en O₂ chez le patient peut mener à une déficience des organes en quelques heures (Chen et al., 2013).

Les marqueurs biochimiques sont importants pour mettre en lumière des activités biochimiques pertinentes en lien avec la sévérité et la progression des maladies pulmonaires.

Il y a cependant peu de biomarqueurs quantifiables disponibles en clinique et pour les utiliser il doit y avoir un prélèvement par biopsie. Il faut donc non seulement un besoin de caractériser de nouveaux marqueurs, mais aussi de développer un moyen pour les détecter sans biopsies (Scherer et al., 2016). L'imagerie optique représente une solution potentielle pour répondre à ce besoin *via* l'utilisation de sondes fluorescentes. La prochaine section abordera les principes physiques de l'imagerie optique et ses applications, pour finir par l'introduction de l'imagerie par MECE, qui représente l'alternative à la biopsie proposée dans le cadre de ce projet.

Imagerie optique

L'imagerie optique consiste à visualiser un sujet *via* une source lumineuse se situant dans le spectre de l'UV, du visible ou du proche infrarouge (NIR), ce qui correspond à des plages de longueur d'onde (λ) de 100 à 400 nm, de 400 à 700 nm et de 700 à 900 nm, respectivement (Giancoli, 1993; Hillman et al., 2011). Les microscopes à épifluorescence, première version de l'imageur optique, ont permis plusieurs avancées en recherche, mais souffrent de plusieurs inconvénients : une résolution latérale limitée et l'impossibilité d'isoler un plan focal (Jensen, 2012; Nature Milestones, 2019). La microscopie confocale pallie certains de ces inconvénients. Le microscope confocal possède un trou d'épingle permettant d'éliminer les rayons lumineux hors de l'objectif afin d'augmenter la résolution axiale jusqu'à 5 μm (Peng et al., 2016). De plus, le chemin optique est composé de lentilles, d'un miroir dichroïque et d'un laser d'excitation monochromatique permettant d'effectuer un balayage, d'isoler des plans focaux et de superposer ces plans afin de reconstruire l'image en trois dimensions (Laurent et al., 1994). Bien que cet outil ait permis de pallier plusieurs inconvénients, la microscopie confocale nécessite des procédures d'histologies telles que des étapes de congélation, de fixation et de coupe, ce qui abîme la structure du tissu et ne permet pas d'imager le tissu d'intérêt *in vivo* en temps réel (Kim et al., 2008; Benias et al., 2018). Il est toutefois possible de combiner un microscope confocal à une fibre optique afin de créer un microendoscope tel que le CellVizio®, l'appareil utilisé dans le cadre de ce projet (Mordon et al., 2005).

La fluorescence

La fluorescence à un photon est un phénomène physique où une molécule émet un photon à la suite de l'absorption de photons d'énergie supérieure provenant d'une source externe (García-Plazaola et al., 2015). Un photon est une onde électromagnétique, c'est-à-dire qu'il est composé de champs magnétique et électrique qui oscillent de façon perpendiculaire l'un par rapport à l'autre. Cette onde oscille à une fréquence qui est proportionnelle à son énergie (Flamand et al., 2010). La longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) sera toujours plus petite (plus énergétique) que la longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ce décalage spectral, appelé le déplacement de Stokes, est causé par une perte d'énergie sous forme de chaleur au cours du processus (Hof et al., 2005).

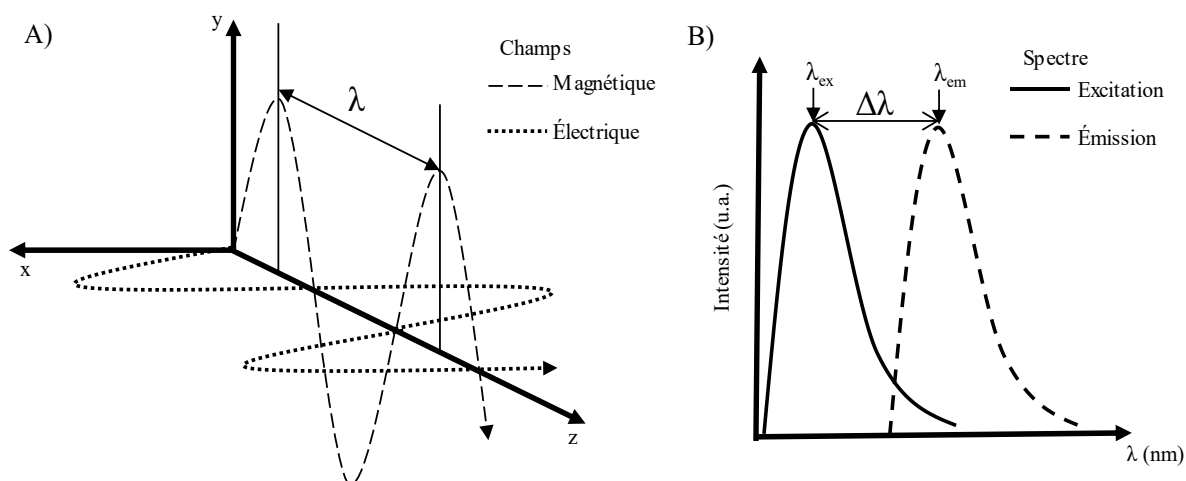


Figure 5 : Schématisation d'une onde électromagnétique et du déplacement de Stokes

A) Représentation des champs magnétique et électrique qui oscillent de façon perpendiculaire l'un par rapport à l'autre selon une λ . B) Représentation d'un spectre de fluorescence fictif qui montre le déplacement de Stokes, soit la différence de longueur d'onde ($\Delta\lambda$) entre le λ_{ex} et le λ_{em} . Le λ_{em} est toujours supérieur comparé au λ_{ex} dû à des pertes d'énergies sous forme de chaleur.

À la suite de l'absorption d'un photon, les électrons du fluorophore passent d'un état électronique fondamental (S_0) à un état excité instable (S_1 , S_2 , [...]). Un retour à l'état S_0 est nommé *relaxation* Lakowicz, 2006). Cette relaxation est partiellement radiative, ce qui provoque l'émission d'un photon, et non radiative, ce qui occasionne des pertes d'énergie sous forme de chaleur (d'où l'origine du déplacement de Stokes). Cette perte d'énergie se

Ce diagramme permet d'illustrer le déplacement des électrons dans les différents niveaux énergétiques S. Les déplacements vers des niveaux énergétiques supérieurs sont représentés par une flèche qui pointe vers le haut, et les déplacements vers des niveaux énergétiques inférieurs sont représentés par les flèches qui pointent vers le bas. L'absorption d'un photon d'excitation (λ_{ex}) permet aux électrons d'atteindre des niveaux énergétiques supérieurs (S_1 ou S_2 par exemple), qui est un état instable. Spontanément, l'électron se relaxe et émet de l'énergie sous forme de chaleur par le phénomène d'IC, ou sous forme de lumière par la phosphorescence ($\lambda_{\text{P}_{\text{em}}}$) par le phénomène d'ISC ou par la fluorescence (λ_{em}).

La fluorescence est caractérisée par l'émission de lumière causée par la relaxation radiative des électrons excités. Étant donné qu'ils se relaxent aussi par effet d'IC et d'ISC (qui sont non radiatifs), il y a une probabilité que la relaxation n'induisse pas l'émission de lumière. Le rendement quantique (ϕ) est une valeur qui quantifie cette probabilité (Lakowicz,

2006). Cette valeur sert d'indicatif à la sensibilité du fluorophore à une source d'excitation d'une longueur d'onde donnée. Plus la valeur de ϕ est près de 1, plus la molécule se relaxera par fluorescence et plus le signal sera intense à une concentration de fluorophore donnée (Hof et al., 2005).

L'atténuation

L'atténuation correspond à une décroissance de l'intensité de la fluorescence (I) par un atténuateur (Q). Cette décroissance est possible par collision, par atténuation statique ou par autoatténuation. Une atténuation par collision est causée par la proximité du fluorophore à un groupement accepteur qui favorise une transition des électrons vers un état fondamental par le biais d'un transfert d'énergie non radiative. Les solvants qui contiennent des amines, de l'O₂ ou des halogènes produisent ce genre de phénomène. Lors d'une atténuation par collision, la relation est linéaire entre la concentration de Q et le rapport de l'intensité lumineuse en absence et en présence de Q (I_0/I) (Lakowicz, 2006). Une atténuation statique peut se faire à distance ou par la formation d'un complexe non fluorescent. Les quinones, les purines et l'hydroquinone sont des exemples de Q qui peuvent former des complexes non fluorescents. Le transfert d'énergie entre molécules (FRET) est un mécanisme qui repose sur le principe d'atténuation statique et c'est grâce à ce phénomène que plusieurs sondes activables sont conçues, en positionnant par exemple un Q à proximité d'un fluorophore séparé par un lien sensible à une réaction enzymatique. Dans le cas d'une atténuation statique, la relation entre $[Q]$ et le ratio I_0/I est non linéaire (Valeur et al., 2012). Finalement, l'autoatténuation est due à une proximité trop grande entre deux fluorophores, situation rencontrée lors d'essais réalisés à trop forte concentration (Zhegalova et al., 2014).

Sources de fluorescence

Fluorescence endogène

La fluorescence endogène, aussi appelée autofluorescence, provient de molécules constitutives du tissu biologique qui possèdent des propriétés fluorescentes. Un changement au niveau de la distribution ou de la concentration de ces molécules peut être un indice de perturbation au niveau de la fonction de l'organe (Haringsma et al., 2001). Plusieurs molécules ont été identifiées, telles que l'élastine, le collagène et la nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée. L'élastine et le collagène ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$), deux protéines qui

constituent la membrane cellulaire basale forment des liens croisés entre eux. Ces liens sont à l'origine de cette fluorescence qui peut varier en situations physiologique, inflammatoire ou de fibrose (Mižíková et al., 2015). L'intensité de la fluorescence de la nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée (λ_{ex} de 430 à 510 nm), un cofacteur essentiel à la phosphorylation oxydative, augmente en condition hypoxique et est utilisée pour imager des zones d'ischémie cardiaque (Wengrowski et al., 2014).

L'avantage de l'autofluorescence est qu'elle permet de donner une image de la structure matricielle du tissu, sans agents intermédiaires. Cependant, la fluorescence endogène est faible, montre une grande variation interindividuelle et ne permet pas de discriminer d'activité biochimique à moins que le métabolite produit soit lui-même fluorescent. C'est pourquoi certaines expériences requièrent l'utilisation d'une molécule fluorescente exogène afin de cibler une structure ou des événements cellulaires d'intérêt.

Fluorescence exogène

Les molécules fluorescentes, utilisées comme sondes moléculaires, peuvent être des molécules simples telles que la fluorescéine, les dérivés de rhodamines et les cyanines. Celles-ci peuvent être conjuguées à différentes biomolécules telles que les lipides, les sucres, les acides nucléiques, les acides aminés, les peptides et les stéroïdes (Mahmoudian et al., 2011; Sarkar et al., 2018). Par exemple, la fluorescéine et l'Alexa Fluor peuvent être conjugués à un dextran de poids moléculaire variable (1 à 70 kDa) pour effectuer des angiographies de la microcirculation (Pantzar et al., 1993; Wu et al., 2011; Huang et al., 2016). Ces molécules simples peuvent aussi être conjuguées à un anticorps afin de cibler un antigène particulier (Mao et al., 2010). Par exemple, l'adalimumab, un anticorps thérapeutique pour traiter la maladie de Crohn dont l'antigène est le récepteur TNF- α est couplé à la fluorescéine isothyocyanate (FITC) (Atreya et al., 2013). Le DiIC18(5); 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzènesulfonate est une molécule fluorescente lipophile qui s'accumule dans la membrane plasmique. Dans l'étude de la thérapie aux cellules souches, cette sonde fluorescente peut être préalablement incubée avec des cellules souches en cultures extraites de la moelle osseuse de rat Sprague-Dawley et de suivre, par imagerie optique, ces cellules implantées dans un modèle de rat d'atteinte pulmonaire induite par les radiations (Perez et al., 2017). Aussi, au lieu d'une cellule, il est possible de conjuguer le fluorophore à une nanoparticule (S. Wolfbeis, 2015). Finalement,

des animaux peuvent être transfectés d'un gène codant pour la protéine fluorescente verte (GFP), par exemple, afin de quantifier l'expression d'un gène (Algubory et al., 2006). Aussi, les sondes moléculaires peuvent être activables, c'est-à-dire que la structure moléculaire est conçue de façon à ce que la fluorescence ne soit émise qu'en présence d'une biomolécule. La sonde acide 4-[6-(4-Aminophénoxy)-3-oxo-3H-xanthène-9-yl]benzène-1,3-disulfonique s'active lorsqu'elle est oxydée par l'acide hypochloreux, un produit de la myéloperoxydase sécrété par les PMN en situation inflammatoire (Shepherd et al., 2007). Plutôt que de cibler un produit, une sonde activable peut cibler une activité enzymatique directement, un mécanisme largement utilisé dans l'étude des protéases, telles que les matriptases, métalloprotéases et les cathepsines (Lebel, 2012; Abd-Elrahman et al., 2016; Yogo et al., 2017). Afin d'augmenter la spécificité, certaines sondes requièrent deux étapes afin d'être activées. Par exemple, la sonde collagène proCNA35 requiert un premier clivage par des métalloprotéases afin de libérer son site de liaison au collagène (Breurken et al., 2011).

Applications de l'imagerie optique

En biologie cellulaire, l'imagerie optique a permis de décrire plusieurs mécanismes physiopathologiques; par exemple, le processus du développement et les interactions protéiques impliquées dans le cancer du poumon chez les fumeurs (Ciruela, 2008; Yu et al., 2013). La microscopie combinée aux méthodes de transfection de la protéine GFP a permis de quantifier l'expression d'un gène autant chez les cellules en culture que dans les modèles animaux (Soboleski et al., 2005; Algubory et al., 2006). Toujours en biologie cellulaire, la fluorescence permet d'imager plusieurs processus tels que le transport du glucose, l'activité neuronale et, bien sûr, d'imager l'apoptose en ciblant plusieurs médiateurs (Blodgett et al., 2011; Chen et al., 2013). Dans le domaine pharmaceutique, cette modalité d'imagerie permet de réaliser des criblages à haut débit, d'étudier l'interaction entre un ligand et son récepteur, de localiser le compartiment cellulaire dans lequel une drogue s'accumule et de suivre la délivrance d'un principe actif chez des modèles animaux (Watson et al., 2005; Furrer et al., 2010; Martinez et al., 2015).

En oncologie, l'imagerie optique permet la détection de mutations génétiques et des lésions prénéoplasiques précoces (Tipirneni et al., 2017). La technique d'hybridation de la fluorescence *in situ* (FISH) est utilisée pour détecter un réarrangement chromosomique du gène *ALK*, une mutation caractéristique du CPNPC, impliquée dans la division des cellules

tumorales. Cela oriente la stratégie thérapeutique à emprunter puisque ce phénotype indique une susceptibilité au crizotinib (Lazzari et al., 2014). De plus, des travaux sont réalisés afin de détecter les mutations du récepteur du facteur de croissance épithélial humain-2 (HER2), présent dans 25 % des cancers du sein, et de combiner ce fluorophore au trastuzumab, un anticorps dirigé contre le récepteur HER2 afin de traiter ce cancer (Penet et al., 2012). Depuis plusieurs années, la fluorescéine, un fluorophore utilisé en ophtalmologie, est injectée par voie intraveineuse afin d'effectuer une angiographie de la rétine pour la détection de dégénérescence maculaire (Cunningham et al., 1979).

Imagerie par microendoscopie confocale par fluorescence (MECF)

L'histologie permet d'établir le profil moléculaire d'un tissu prélevé et constitue une étape déterminante afin de poser un diagnostic complet en clinique. Le prélèvement de ce tissu est possible par biopsie. L'imagerie par MECF a apporté le concept de *biopsie virtuelle*, c'est-à-dire que cela rend possible la caractérisation directe des muqueuses à l'échelle moléculaire sans prélèvements. En 1996 apparaît un article qui montre l'utilisation d'un microendoscope confocal (Optiscan, Australie) afin de suivre la régénération du nerf tibial chez le rat par MECF (Cushway et al., 1996). Cependant, l'Optiscan était doté d'un applicateur optique rigide qui fait plus de 6 mm de diamètre et qu'il n'était composé que d'un laser et d'un canal de détection. En 2000, la compagnie MaunaKea Technologies (Paris, France) est lancée et met sur le marché le CellVizio®, le microendoscope confocal utilisé dans le cadre de ce projet.

Le CellVizio® possède trois composantes principales : une sonde flexible composée de 30 000 microfibres optiques, un compartiment optique et un détecteur pour reconstruire l'image. Sur le marché, les sondes flexibles ont un diamètre variant de 0,350 à 1,5 mm permettant l'exploration de zones distales (Newton et al., 2012; Chauhan et al., 2014). Les caractéristiques de l'image varient en fonction de la sonde flexible utilisée. Le champ de vue varie entre 240-600 μm de diamètre et la résolution axiale/latérale entre 2.5-5/15-20 μm . Le pouvoir pénétrant se situe entre 30 et 100 μm (Laemmel et al., 2004; Mordon et al., 2005). Le compartiment optique est composé de deux lasers d'excitation (488 et 660 nm), d'un coupleur, de lentilles et de miroirs oscillants pour effectuer un balayage sur une section optique. Le détecteur possède deux canaux de bandes passantes se situant dans le vert (505-650 nm) et le NIR (680-900 nm) (Vercauteren, 2008).

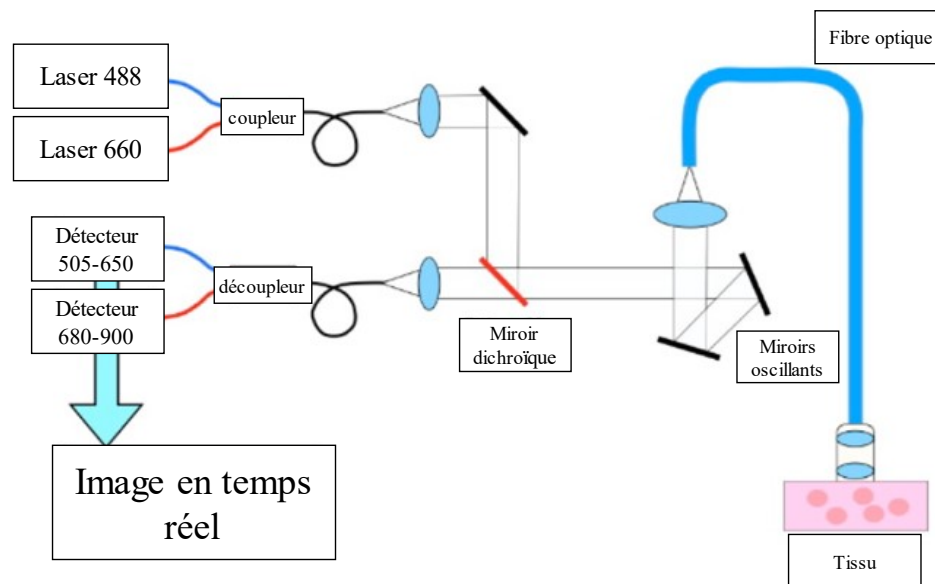


Figure 7 : Schéma optique du CellVizio®

Les lasers émettent des faisceaux à 488 et 660 nm qui passent dans un coupleur puis par une série de lentilles et de miroirs qui les dirigent vers la fibre optique. En établissant un contact entre la fibre optique et le tissu, les lasers excitent des fluorophores sur le tissu qui va à son tour émettre de la lumière. La fluorescence du tissu repasse dans la fibre optique, est réfléchi par les miroirs oscillants et passe au travers du miroir dichroïque pour être détectée par les canaux de détection se situant dans le vert (505-650 nm) ou le NIR (680-900 nm). *L'image est une gracieuseté de Mauna Kea Technologies et a été traduite avec leur permission.*

Déjà en 2004, un article démontre chez la souris des variations du diamètre des vaisseaux sanguins du muscle crémaster suite à l'administration de noradrénaline et d'acétylcholine i.v. visible au CellVizio® (Laemmel et al., 2004). En gastroentérologie, une méta-analyse regroupant 102 études, représentant 6943 patients, démontre la pertinence de l'utilisation de la MECF en combinaison avec la fluorescéine pour détecter plusieurs anomalies gastro-intestinales et hépatobiliaires telles que la dysplasie de Barrett, des polypes intestinaux, des kystes pancréatiques et des lésions pancréatiques malignes (Fugazza et al., 2016). Dans une autre étude comprenant 14 patients présentant un carcinome du canal urothélial supérieur, les images acquises par MECF permettent d'établir le même diagnostic comparé à l'histologie dans 83 % des cancers de haut grade et 100 % des cancers de bas grade (Breda et al., 2018). L'imagerie par MECF est aussi appliquée en pharmacologie. L'innocuité du losartan sur la perméabilité de la barrière hématoencéphalique chez le rat a été démontrée par MECF (Bar-Klein et al., 2014). L'imagerie en direct par la MECF permettrait d'éliminer des étapes de prélèvements et d'histologie, facilitant grandement le

développement de nouvelles thérapies contre le cancer, par exemple le développement de thérapie à l'ARN interférant (Rafael et al., 2018). Le graphique ci-dessous montre une compilation d'articles provenant de la banque de données de la compagnie Mauna Kea Technologies, où ils utilisent le CellVizio®.

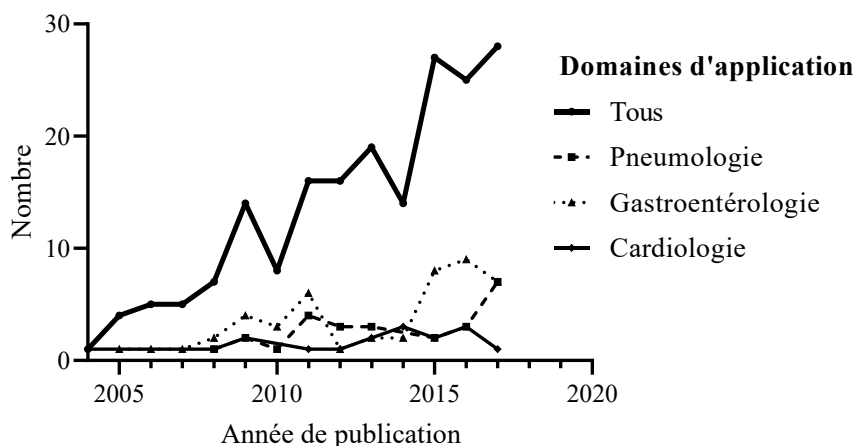


Figure 8 : Publications utilisant le CellVizio®

Le graphique ci-dessus montre une compilation d'articles provenant de la banque de données de la compagnie Mauna Kea Technologies, où ils utilisent le CellVizio®. Le nombre d'articles par année est passé de 3 à environ 30 en 12 ans. L'imagerie par MECF a pris une grande importance en gastroentérologie, en pneumologie et en cardiologie. Les domaines d'application deviennent de plus en plus diversifiés tels que l'immunologie, l'urologie et la pharmacologie.

MECF en pneumologie

En pneumologie, la MECF permettrait facilement le suivi des lésions précancéreuses ou des dysplasies en comparant l'organisation du tissu altéré au tissu sain. L'acquisition de ces images peut être réalisée par bronchoscopie sous anesthésie locale. Il suffit d'insérer la fibre optique dans les voies aériennes et d'établir un contact avec une muqueuse (Fuchs et al., 2013).

Les images peuvent être formées en captant la lumière provenant du tissu lui-même par 6 autofluorescence ou d'une molécule exogène préalablement administrée. Au niveau pulmonaire, l'autofluorescence à 488 nm des voies aériennes proximale et distale provient essentiellement de l'élastine, qui représente plus de 50 % du tissu conjonctif pulmonaire présent dans les zones subépithéliales (Bourg-Heckly et al., 2008). L'organisation de l'élastine varie en fonction de la localisation dans les voies aériennes ce qui permet donc de

distinguer les parois, les ouvertures, les muscles lisses des bronchioles et les capillaires sanguins (Zaric et al., 2013). Chez les individus fumeurs, l'autofluorescence permet de voir un recrutement important de macrophages et un contraste important des fibres d'élastine comparativement aux non-fumeurs. Cependant, il n'est pas possible de confirmer si cette autofluorescence provient du dépôt de différents composés chimiques de la fumée primaire sur les muqueuses (Thiberville et al., 2009). L'administration de fluorescéine permet d'augmenter le contraste en s'infiltrant dans l'espace interstitiel, sans pénétrer les cellules, ce qui permet de voir l'organisation du tissu, mais limite l'acquisition de données au niveau de la fonction de ce même tissu. L'acriflavine pénètre les cellules et lie l'ADN, ce qui permet de visualiser des cellules, mais présente des propriétés cytotoxiques. Néanmoins, il est possible d'observer par la distribution de l'acriflavine dans les tissus dysplasiques une désorganisation cellulaire, une dégradation de la matrice ainsi que des zones noires suspectées d'être des cellules nécrotiques (Streba et al., 2016). Le bleu de méthylène est un agent non toxique qui lie l'ADN de façon réversible et qui émet dans le NIR, détectable avec le canal à 660 nm du CellVizio® (Obstoy et al., 2015). Bien que ces molécules exogènes aient permis d'imager les cellules, il est toujours impossible de visualiser une activité biochimique qui est fondamentale en clinique pour poser un diagnostic complet. C'est pourquoi certains laboratoires ont décidé de développer des sondes exogènes intelligentes qui permettent de discriminer une activité biochimique pertinente.

Notre laboratoire a publié un article sur la caractérisation de la sonde DSAPF par MECF qui est activée lorsqu'elle est oxydée par l'hypochlorite de sodium, un produit de la myéloperoxydase sécrétée par les PMN activés. Les images sont acquises par voie endoscopique avec le CellVizio®. Le ratio signal sur bruit de rats traités au LPS intratrachéal (3 mg/kg 24 h) est comparé aux rats contrôles et aux rats prétraités avec un inhibiteur de la myéloperoxydase, l'ABAH (80 mg/kg i.p.). Il est démontré que chez les poumons de rats traités au LPS, le signal sur bruit augmente de 60 % par rapport au contrôle et se normalise lorsqu'il y a un prétraitement au ABAH (Chagnon et al., 2015).

Une sonde couplée à la polymyxine, la NBD-PMX est conçue pour lier les lipides A, une molécule exposée sur les bactéries Gram négatif. Cette sonde a été testée avec le CellVizio® chez 6 patients présentant une infiltration pulmonaire possiblement causée par une pneumonie. La quantification est réalisée en comptant la proportion d'images des vidéos

qui montrent plus de 160 points, représentant des bactéries marquées par la sonde NBD-PMX instillée chez le patient. Les résultats montrent que près de 60 % des images des vidéos montrent plus de 160 bactéries marquées suite à l'injection de NBD-PMX (Akram et al., 2018).

Plusieurs traitements disponibles pour le CPNPC consistent à inhiber certaines voies mitogéniques qui leur sont caractéristiques, tels que EGFR et ALK, qui sont impliqués dans la prolifération anarchique des cellules tumorales. La méthode FISH est utilisée en clinique afin de détecter des réarrangements chromosomiques du gène *ALK*, une mutation retrouvée dans 5 % des CPNPC qui cause une activation constitutive des cascades signalétiques mitogéniques. Cette méthode n'est applicable que sur des tissus prélevés, car aucun appareil n'est disponible pour le visualiser *in vivo* chez l'humain (Gao et al., 2015). Au niveau préclinique, des anticorps permettant d'établir un phénotype tumoral sont surtout appliqués dans un contexte de cancer colorectal. Des anticorps anti-EGFR sont validés chez la souris, ce qui permettrait de détecter et de traiter des cancers de façon précoce (Goetz et al., 2010). Il est possible d'observer une fluorescence spécifique par MECE par le biais de l'anticorps anti-EGFR chez la souris dans 13/15 des modèles de cancer colorectal APCmin et dans 9/10 chez le modèle d'implantation orthotopique (Foersch et al., 2010).

Chez l'humain, il est rapporté que la procédure de bronchoscopie couplée au MECE ne cause aucun effet indésirable chez les patients atteints d'une maladie pulmonaire interstitielle ce qui permet de différencier les tissus fibrotiques des tissus sains par autofluorescence (Wijmans et al., 2019). Il est aussi rapporté dans une étude comportant une cohorte de 41 individus en santé, éveillés et sans support ventilatoire que la procédure par MECE est indolore, très bien tolérée et ne nécessite qu'une anesthésie locale. Aucune complication n'a été rapportée (Thiberville et al., 2009). Chez 32 patients suspectés d'avoir un cancer, l'imagerie par MECE couplée à l'acriflavine est aussi bien tolérée, ce qui permet de prédire des changements néoplasiques avec une sensibilité de 96 %, une spécificité de 87 % et une précision de 91 % (Fuchs et al., 2013).

Dans notre contexte, l'imagerie par MECE est réalisée par voie endoscopique chez le rat. Les voies aériennes proximales sont accessibles, mais atteindre les voies aériennes distales demeure un défi. Les principales raisons sont :

- 1) Réaliser une endoscopie par les voies naturelles chez le rat est faisable, mais plus difficile compte tenu de la petite taille de l'animal.
- 2) L'absence de guidance à cause du petit champ de vue, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de situer exactement la localisation de la fibre optique dans l'organe. Atteindre les voies aériennes distales devient hasardeux et augmente le risque de perforation (Ball et al., 2017),
- 3) La sonde n'est flexible que jusqu'à un certain point. La flexibilité de la fibre optique n'est pas suffisante pour circuler aisément dans l'arborescence orthogonale des voies aériennes (surtout avec des angulations de plus de 45°) ce qui ne permettent pas d'atteindre directement aux alvéoles ou les zones apicales par voie endoscopique (Thiberville et al., 2009).

Pour pallier la contrainte de taille, il est possible de réaliser une trachéotomie sous anesthésie afin d'éviter le passage des voies naturelles. Il serait aussi possible d'utiliser un gros animal. Chez le cochon, les voies aériennes sont de plus gros diamètre et forment une arborescence monopodiale, ce qui permettrait d'atteindre les zones distales plus facilement malgré la rigidité de la fibre optique (Judge et al., 2014). Lors d'une collaboration avec l'Université McGill, nous avons couplé la MECF avec la TDM afin de localiser approximativement la fibre optique dans le poumon, ce qui permet de situer les zones d'intérêt et de pallier l'inconvénient causé par le petit champ de vue (Perez et al., 2017).

Présentement, des essais cliniques montrent déjà la pertinence de la MECF par autofluorescence ou par le biais d'un marqueur non spécifique (fluorescéine, acriflavine ou bleu de méthylène). Des essais précliniques sont en cours afin de valider des sondes moléculaires spécifiques et d'imager l'inflammation, des antigènes sur la surface des tumeurs ou comme dans le cadre de ce projet : l'apoptose qui survient par exemple, lors de la résolution de l'inflammation ou lors d'une réponse positive à un agent de chimiothérapie.

Physiologie de la mort cellulaire

L'étude de la mort cellulaire montre qu'elle est paradoxalement essentielle à la vie. Les organismes eucaryotes sont souvent des espèces composées de plusieurs milliards de cellules dont certaines se divisent et d'autres meurent. L'embryogenèse est un exemple où il y a un équilibre finement régulé entre la division et la mort cellulaire massive le tout afin d'assurer la formation d'un individu viable. Une résistance à la mort cellulaire peut mener à

l'apparition de tumeurs et, à l'inverse, une sensibilité peut induire une dégénérescence fonctionnelle (Savitskaya et al., 2015).

Pendant un siècle et demi, la mort cellulaire était caractérisée selon la morphologie (Timmons et al., 2016). C'est seulement depuis quelques décennies, avec l'étude des mécanismes de signalisation, qu'il est possible dans un premier lieu d'expliquer ces changements morphologiques et puis en distinguer des sous-types de mort cellulaire (Kroemer et al., 2009). Elle peut se classer en deux catégories, soit la mort non programmée et programmée. Cette section vise à présenter les différents types de morts cellulaires et leurs caractéristiques.

La mort cellulaire non programmée

Ce type de mort, appelée « *nécrose* » est une mort cellulaire caractérisée par la déplétion de l'adénosine triphosphate, d'une importante production de ROS et d'une réaction inflammatoire. Ce type de mort est induit lorsque les cellules se retrouvent dans un environnement extrême ou lorsqu'elles sont soumises à un stimulus trop intense (Golstein et al., 2007). Les événements morphologiques comprennent un gonflement de la cellule, une dilatation des organelles, et une perméabilisation de la membrane plasmique. Il est possible d'observer une condensation de la chromatine et une désintégration du noyau. Cependant, la pyknose et la fragmentation nucléaire sont des événements peu communs (Ziegler et al., 2004). Depuis les dernières décennies, la nécrose est considérée comme une mort non contrôlée expliquant le fait que ce type de mort, surtout lorsque massive, entraîne souvent une perte de fonction de l'organe.

L'étude du mécanisme intracellulaire de la nécrose a permis de découvrir qu'il peut survenir des événements contrôlés qui peuvent être inhibés (Timmons et al., 2016). Ces observations ont permis d'apporter le concept de « *nécroptose* », qui est un type de mort cellulaire contrôlée qui survient lorsque les conditions ne sont pas optimales au déclenchement de la cascade de signalisation apoptotique. Cette mort est médiée par les protéines kinase d'interaction aux récepteurs 1 et 3, ainsi que de la pseudo-kinase de domaine de lignée connexe mixée (Alvarez-Diaz et al., 2016). Une mort qui longtemps fut considérée comme non programmée présente une certaine mécanistique modulable caractéristique d'un processus programmé, mais ce fait est encore débattu aujourd'hui.

Morts cellulaires programmées

Il existe plusieurs types de morts cellulaires programmées. La pyroptose est la mort induite en réponse à une réaction inflammatoire. Elle est médiée entre autres par les caspases inflammatoires 1, 4 et 5. La pyroptose est caractérisée par la formation de l'inflammasome, une structure essentielle à l'activation des caspases inflammatoires (Man et al., 2015). Ce processus constitue un moyen de défense contre les pathogènes, car les caspases 1, 4 et 5 activent les interleukines-1 β et 18. Ces interleukines pro-inflammatoires activent les PMN ce qui amplifie la réaction inflammatoire (Sahoo et al., 2011). Il y a aussi l'autophagie qui est un processus par lequel la cellule s'autodigère sous l'action du glucagon, l'hormone pancréatique qui déclenche le catabolisme glucidique lors d'un stress énergétique sévère (Glick et al., 2010). Le médiateur principal est la protéine de la cible mécanistique de la rapamycine, une kinase qui régule les voies anaboliques, les voies mitogéniques et la biogenèse des ribosomes. Cette mort est aussi médiée par le complexe Beclin-1/VPS34 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique des protéines liées à l'autophagie et les protéines associées à la courte chaîne légère-1A/1B des microtubules de la membrane lysosomale (Díaz-Troya et al., 2008). Ensuite, il y a la catastrophe mitotique qui est une mort cellulaire due à une altération de la ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire (Gee et al., n.d.). Elle peut être déclenchée par une perte de contrôle au niveau de l'activation du complexe formé par la kinase dépendante des cyclines-1 et de la cycline B qui contrôle la transition de la phase G2 à la phase M de la division cellulaire. Elle peut survenir pendant (ou après) la métaphase ou bien à la suite d'une mitose avortée. Dans le cas d'une mitose avortée, il y a une dépendance du facteur de transcription p53 (Castedo et al., 2004). Finalement, le processus de cornification qui est essentiel à la formation et la préservation de la peau, des cheveux et des ongles. La cornification se démarque par la transformation du cytosquelette et des organelles en une masse protéique compacte et la formation d'une couche de cornification insoluble en périphérie (Eckhart et al., 2013). Les principaux médiateurs sont les transglutaminases, la caspase 14 et la DNase1L2 (Denecker et al., 2008).

Il existe bien sûr plusieurs autres types de morts cellulaires telles que l'éryptose (sénescence des globules rouges) (Lang et al., 2015), l'entose (engouffrement d'une cellule vivante par une autre) (Yuan et al., 2010) et l'empéripolèse (idem que l'entose, mais qui induit la mort de la cellule hôte) (Rastogi et al., 2014).

L'apoptose

L'apparition des marquages colorimétriques dans les années 1885 a permis à Walther Flemming d'observer les premiers changements morphologiques permettant de différencier la mort cellulaire programmée de la nécrose (Gupta, 1996). Le terme « *apoptose* » est décrit pour la première fois par Kerr et son équipe en 1972. Kerr observait déjà des changements morphologiques qui se produisaient en deux étapes, soit la condensation du cytoplasme puis la formation des corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). L'étude des messagers intracellulaires a montré que la cascade de signalisation apoptotique peut se faire *via* deux voies, soit les voies extrinsèque et intrinsèque. Il existe aussi la voie des perforines, médiée par la Granzyme-B activée par une réaction immunitaire directe, mais cette voie ne sera pas abordée dans le cadre de ce mémoire.

Signalisation de l'apoptose

La voie extrinsèque implique l'activation du récepteur de la mort. Jusqu'à maintenant, ces récepteurs comptent 8 membres. La différence entre ces membres réside dans la composition en acides aminés du domaine de la mort qui recrute différentes protéines essentielles au déclenchement de la cascade signalétique (Lavrik et al., 2005). Le récepteur au TNF- α est un exemple de récepteur de la mort. Lorsque le TNF- α se lie au récepteur il y a changement de conformation du domaine de la mort et ce changement conformationnel permet le recrutement de la protéine adaptatrice du domaine de la mort associé à Fas ou de la protéine du domaine de la mort associé au récepteur TNF- α . Le tout forme le complexe de signalisation induite par la mort qui permet le recrutement des pro-caspases 8 ou 10 via leurs domaines effecteurs de la mort (Elmore, 2007). Cette interaction permet la dimérisation et le clivage de ces pro-caspases en caspases actives. Les caspases 8 et 10 activent ensuite par clivage les pro-caspases 3 et 7 et à leur tour, clivent plus de 2000 substrats intracellulaires, dont la Poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) qui est un marqueur de l'apoptose et le premier substrat ayant été identifié (Chaitanya et al., 2010).

La voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, n'est pas activée par les récepteurs de la mort. Celle-ci peut-être induite par plusieurs agents cytotoxiques (chimiothérapie ou inhibiteurs de kinases), par des ROS, par les ultraviolets (UV) ou par l'absence de facteurs de croissance (Shakeri et al., 2017). L'activation de la voie intrinsèque

induit une perturbation de la différence de potentiel membranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) qui permet la libération du cytochrome *c* (cyt *c*). Le cyt *c*, ainsi que le désoxyadénosine triphosphate sont des éléments essentiels à l'heptamérisation de 7 complexes du facteur-1 d'activation des protéases apoptotiques, composé des domaines de recrutement et d'activation des caspases et des domaines WD40 et Ced-4-like. Cette heptamérisation permet de former une structure protéique appelée *apoptosome*, qui peut interagir avec la pro-caspase 9 ce qui permet sa dimérisation et son auto-clivage. La caspase 9 clive ensuite les pro-caspases exécutrices 3 et 7 en leur forme active (Zhou et al., 2015). Les voies extrinsèques et intrinsèques communiquent entre elles. La caspase 8 peut cliver la protéine agoniste de la mort du domaine d'interaction-BH3 (Bid) en Bid tronquée. Par le domaine BH3, il y aura hétérodimérisation des protéines de la famille des lymphomes des cellules B 2 (Bcl-2) proapoptotiques tels que la protéine homologue antagoniste/tueuse aux Bcl-2 et la protéine X associée aux Bcl-2. Ces dimères forment des pores sur la membrane externe mitochondriale, ce qui entraîne la perte du $\Delta\Psi_m$, la relâche du cyt *c* et la formation des apoptosomes qui activent la caspase 9 puis les caspases exécutrices 3 et 7 (Wang et al., 2013).

Il y a plusieurs éléments de régulation de l'apoptose. Par exemple, la protéine inhibitrice liée au chromosome X peut empêcher l'activation des caspases 3, 7 et 9 (Srinivasula et al., 2001; Suzuki et al., 2001). Les protéines de la famille des Bcl-2 sont des protéines qui régulent la cascade apoptotique et sont classées selon trois catégories, soit les effecteurs, les suppresseurs et les activateurs (Cory et al., 2003). Les homologues Bcl-2 jouent le rôle d'effecteur puisqu'ils induisent directement la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale et cause la perte du $\Delta\Psi_m$ et la libération du cyt *c*. Les suppresseurs, comme les protéines Bcl-2 extra large et la protéine de la séquence myéloïde-1 de cellules de leucémie, peuvent inhiber les protéines effectrices et empêcher la formation des pores. Finalement, les activateurs tels que Bid tronqué, la protéine ressemblant aux Bcl-2 11 et le modulateur de l'apoptose activé par p53 jouent un rôle de sensibilisateur, c'est-à-dire qu'ils potentialisent la mort cellulaire en inhibant les suppresseurs et en activant les effecteurs (Papaliagkas et al., 2007).

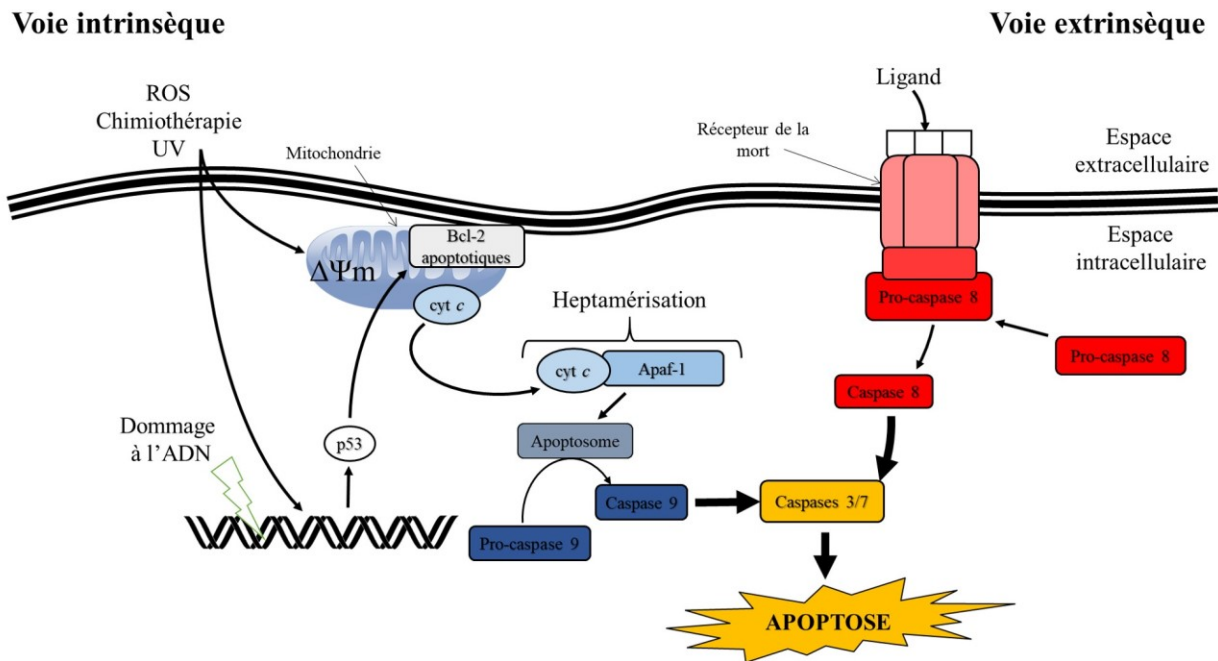


Figure 9 : Voies d'activations intrinsèque et extrinsèque de la cascade apoptotique

L'apoptose peut être induite par la voie extrinsèque (où les médiateurs Voies d'activations intrinsèque et extrinsèque de la cascade apoptotique sont colorés en rouge) ou intrinsèque (où les médiateurs sont colorés en bleu). L'activation de **la voie extrinsèque** nécessite l'activation du récepteur de la mort par son ligand qui induit un changement conformationnel qui permet le recrutement de la pro-caspase 8 ou 10. **La voie intrinsèque** est caractérisée par la perte du $\Delta\Psi_m$ qui provoque la relâche du cyt *c* essentiel à la formation des apoptosomes (un heptamère de complexe du facteur-1 d'activation des protéases apoptotiques et de cyt *c*) qui active la caspase 9. L'activation des caspases initiatrices 8, 9 ou 10 permet d'activer les caspases exécutrices 3 et 7 (colorées en jaune) ce qui marque le point de non-retour représenté par les flèches en gras. Ces caspases exécutrices clivent leurs substrats ce qui provoque l'apoptose.

Les caspases

L'étymologie du mot *caspase* provient des termes *Cysteine ASPartyl-specific ProteASE*. La structure de ces enzymes est composée d'un domaine N-terminal variable d'une enzyme à une autre puis d'un domaine catalytique C-terminal. Le domaine N-terminal constitue le domaine régulateur et le domaine catalytique C-terminal est composé d'une petite et d'une grande sous-unité séparées d'une séquence peptidique flexible et clivable qui est essentielle à l'activation des caspases.

Cette famille de protéase compte 11 enzymes classées selon leur fonction. Il y a les caspases inflammatoires (1, 4 et 5) impliquées dans le processus inflammatoire normal et dans la pyroptose. La caspase 14 est quant à elle impliquée dans la cornification. Les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 sont les médiateurs de la cascade apoptotique. Les caspases ont dans leur site actif un résidu cystéine qui clive de façon spécifique les liens peptidiques suivant un résidu acide aspartique.

Les caspases apoptotiques sont catégorisées selon leur fonction dans la cascade apoptotique, soit les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et exécutrices (3, 6 et 7) ; la classification de la caspase 2 demeure cependant nébuleuse (Kumar, 2009). Elle est la seule caspase à se retrouver au niveau du noyau et est activée en cas de dommage à l'ADN (Bouchier-Hayes, 2010). Les caspases 8 et 10 sont impliquées dans l'activation de la voie extrinsèque. Leur activation se fait par la dimérisation avec le complexe de signalisation d'induction de la mort. La caspase 10 n'est pas exprimée chez les rongeurs, un fait limitant en recherche pour les études génétiques (Wachmann et al., 2010).

Le rôle des caspases initiatrices 8 et 10 est d'activer les caspases exécutrices 3 et 7. Ces dernières ont des substrats semblables, mais ont des rôles néanmoins différents. Le consensus semblant se dessiner des différentes études d'ablation génétique chez la souris et certaines lignées cellulaires est que la perte de la caspase 3, et non celle de la caspase 7, entraîne une augmentation de la résistance à l'apoptose (Walsh et al., 2008). Les caspases 8 et 10 peuvent aussi cliver Bid en Bid tronqué, qui va induire la perte du $\Delta\Psi_m$ et déclencher la voie apoptotique intrinsèque (Chen et al., 2002). Le rôle principal de caspase 9 est d'activer les caspases exécutrices 3 et 7 (Kuida, 2000). La caspase 6 est quant à elle directement activée par la caspase 3 (Desroches et al., 2016). L'activation des caspases exécutrices 3 et 7 constitue le point de non-retour dans la cascade apoptotique. Lorsqu'elles sont activées, les caspases exécutrices clivent plusieurs protéines structurales (par exemple les lamines nucléaires et la vimentine) et fonctionnelles (PARP-1 ou Bid). De plus, elles stabilisent les formes actives des caspases initiatrices, contribuant ainsi à maintenir la cascade de signalisation apoptotique. Par exemple, la caspase 6 clive la caspase 8 afin de stabiliser le dimère (Cowling et al., 2002; Boatright et al., 2003). La caspase 3 clive la caspase 9 la rendant

invulnérable à la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (Srinivasula et al., 2001; Denault et al., 2007).

Tableau 1 : Caractéristiques des caspases apoptotiques

Caspase	Type	Séquence préférentielle	Rôle	Exemples de substrats	Références
2	Non classée	-VDVAD↓-	Controversé. Réponse aux dommages à l'ADN	Caspase 2, Bid, Golgi-160	(Mancini et al., 2000; Desroches et al., 2016)
3	Exécutrice	-DEVD↓-	Protéolyse de masse	Caspases 6/8, ICAD, PARP-1	(Stennicke et al., 1997)
6	Exécutrice	-VEID↓-	Protéolyse de masse	NuMa, Lamines	(Cho et al., 2013)
7	Exécutrice	-DEVD↓-	Protéolyse de masse	PARP-1, Chaperonne p23	(Walsh et al., 2008)
8	Initiatrice	-IETD↓-	Signalisation extrinsèque	Caspases 3/7, Bid	(Beaudouin et al., 2013)
9	Initiatrice	-LEHD↓-	Signalisation intrinsèque	Caspases 3/7/9	(Lüthi et al., 2007)
10	Initiatrice	-IETD↓-	Signalisation extrinsèque	Caspases 3/7, Bid	(Wachmann et al., 2010)

La mort cellulaire en fluorescence

Dans le cas de l'apoptose, il existe plusieurs marqueurs qui ciblent différents événements du processus apoptotique tels que l'exposition des phosphatidylsérines, la perturbation du $\Delta\Psi_m$, la dégradation de l'ADN et l'activité des caspases 3 et 7 (Vorobjev et al., 2017). L'annexine V se lie aux phosphatidylsérines exposés et est combinée à l'iodure de propidium, un marqueur de mort cellulaire avancée afin d'exclure ces cellules (Niu et al., 2010). L'iodure de propidium peut être remplacé par le 7-actinomycine D (7-AAD) dont le signal est plus stable dans le temps (Falzone et al., 2010). La perte de $\Delta\Psi_m$ peut être ciblée par plusieurs molécules (Rho123, DiOC₆ ou CMXRos), mais JC-1 semble être le plus approprié (Mathur et al., 2000). En condition physiologique, JC-1 est à la fois sous forme

monomérique dans le cytosol et émet de la fluorescence verte ($\lambda_{em} = 525$ nm) et sous forme d'agrégat dans la mitochondrie et émet dans l'orange ($\lambda_{em} = 595$ nm). En condition apoptotique, la perte du $\Delta\Psi_m$ empêche JC-1 de pénétrer la mitochondrie diminuant la fluorescence orange (Keil et al., 2011). JC-1 présente des lacunes au niveau de sa solubilité et une version modifiée, JC-10 montre une solubilité améliorée. La méthode *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) ou le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) sont utilisés pour imager la fragmentation nucléaire qui est un évènement tardif de l'apoptose (Yamada et al., 2006; Mandelkow et al., 2017). D'autres sondes ciblent d'autres éléments dépendamment du type cellulaire étudié. Par exemple, une augmentation du taux de zinc intracellulaire est signe d'apoptose chez les neurones et une sonde sensible à cet ion peut être utilisée (Hu et al., 2015).

La caspase 3 clive les protéines qui contiennent la séquence peptidique -Asp-Glu-Val-Asp- (-DEVD-) (Elmore, 2007). Cette séquence est intégrée dans les structures de sondes moléculaires afin qu'elles soient reconnues et clivées par la caspase 3. Les substrats fluorescents qui ciblent la caspase 3 commerciaux contiennent le 7-amino-4-méthylcoumarine ou bien le 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine comme fluorophore mais ils ne traversent pas la membrane plasmique (Poręba et al., 2013). Par contre, les substrats fluorogéniques CellEventTM et NucView[®] 488 sont des substrats commerciaux qui traversent la membrane plasmique. Ces substrats sont applicables en cytométrie en flux plutôt qu'en microscopie. Finalement, ces molécules ne sont pas disponibles dans le NIR. La littérature (voir tableau 2) reporte plus de sondes caspase 3 expérimentales compatibles au NIR, mais leur caractérisation est limitée aux conditions *in vitro* et *in cellulo*.

Tableau 2 : Liste de sondes fluorescentes ciblant la caspase 3

Molécule	Mécanisme	Contexte/Système	Référence
Peptide (sans nom)	FRET	Lignée HeLa	(Mizukami et al., 1999)
Peptide (sans nom)	FRET	Lignée HeLa	(Zhou et al., 2006)
TcapQ ₆₄₇	FRET	Lignées KB3-1 et Jurkat	(Bullok et al., 2007)
AB50 et tAB50	Activation par clivage	Cancer	(Edgington et al., 2009)
NHGcas546	FRET	Lignée HeLa	(Kihara et al., 2009)
KcapQ	FRET	Lignée HeLa	(Maxwell et al., 2009)
QCASP3.2	FRET	Accident vasculaire cérébral Neurodégénérescence	(Debunne et al., 2011 a; Jolivel et al., 2014)
Z-DEVD-aminoluciférine	Bioluminescence	Cancer	(Scabini et al., 2011)
AdpcFLUC	Transfection/ bioluminescence	Lignée AML12	(Ozaki et al., 2012)
TAMRA	FRET	Essai sur protéine	(Lee et al., 2014)
p-SCAT3-DEVG	FRET	Maladies neurodégénératives	(Lossi et al., 2016)

En imagerie optique, l'image est formée par la détection de photons dans la plage du visible et du NIR. L'énergie de ces photons est sous le seuil de l'ionisation ; la technique ne requiert pas d'installations dispendieuses et sophistiquées comparativement à la TEP ou l'IRM (Licha et al., 2005). La lumière provenant du tissu peut-être émise par fluorescence ou par bioluminescence qui est une émission de lumière produite par une réaction biochimique tel que la transformation de la D-luciférine par la luciférase (Zinn et al., 2008). Le désavantage majeur de l'imagerie optique est la forte absorption et la diffusion de ce spectre lumineux par les tissus biologiques limitant son utilisation *in vivo* (Jensen, 2012). Le NIR est moins absorbé, ce qui augmente son pouvoir pénétrant, mais ce n'est pas suffisant pour faire de l'imagerie optique sur corps entier chez l'humain (Leblond et al., 2010; Owens et al., 2016). Pour imager les organes internes, l'utilisation d'une fibre optique par microendoscopie permet d'imager les tissus, mais sur un petit champ de vue et non sur corps entier (Kim et al., 2008).

L'apoptose visualisée par MECF

La sonde commerciale YO-PRO-1, injectée intralutéale, a été utilisée afin d'imager l'apoptose de corps jaune sur un ovaire de brebis extériorisé par laparotomie ventrale (Al-Gubory, 2005). Les auteurs ont comparé l'activité apoptotique de corps jaunes sains et traités à la prostaglandine $F_{2\alpha}$ afin d'y induire une régression. Une analyse qualitative des images obtenues au CellVizio® montre une fluorescence plus élevée chez les corps jaunes traités à la prostaglandine, mais aucune quantification n'est rapportée.

La sonde FLIVO a été visualisée avec l'Optiscan (Goetz et al., 2010). L'auteur a acquis des images par MECF du foie chez 49 souris C57BL/6 traitée avec Jo2, un ligand du récepteur de la mort, à une dose de 0,1 $\mu\text{g/kg}$ i.v. afin d'induire l'apoptose. La sonde FLIVO lie les caspases actives et inhibe leur activité. Lorsque la sonde FLIVO est administrée 105 min après le traitement au Jo2, une analyse qualitative des images obtenues avec l'Optiscan montre un signal de la sonde FLIVO au niveau nucléaire plutôt que cytoplasmique, ce qui n'est pas le cas chez les contrôles non traités, et permet de distinguer une perte d'intégrité du noyau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en histologie par une coloration au TUNEL, qui montre de multiples cellules apoptotiques distribuées de façon homogène dans les coupes de tissu hépatique prélevé chez les rats traités au Jo2 comparativement aux non-traités.

Finalement, le substrat commercial de la caspase 3 NucView® 488 (i.v. 2 nmol) a été testé afin d'évaluer s'il était possible de détecter une réponse positive à un agent de chimiothérapie (Guisier et al., 2017). L'auteur a utilisé des souris nues implantées par voie sous-cutanée avec des cellules résistantes (A549 et H1975) et hypersensibles (HCC827) à l'erlotinib, un inhibiteur d'EGFR et de HER1. Les images MECF ont été acquises *ex vivo* par le CellVizio®. Dans cet article, l'efficacité de l'erlotinib est démontrée en comparant le ratio d'intensité de fluorescence entre les différentes lignées implantées. Le ratio d'intensité de fluorescence correspond à ;

$$\text{Équation 1 : RIF} = \frac{\sum_{i=1}^{10} a_i}{\sum_{i=1}^{10} b_i}$$

Où :

RIF = ratio d'intensité de la fluorescence

a = la fluorescence médiane la plus élevée de NucView® 488 sur 1 image, i.

b = la fluorescence médiane la plus élevée de l'autofluorescence sur 1 image, i.

Dans l'article de Guisier, le ratio obtenu chez les HCC827 hypersensibles à l'erlotinib ($2,07 \pm 0,21$) est supérieur comparativement aux lignées résistantes A549 et H1975 ($1,27 \pm 0,03$ et $1,16 \pm 0,08$, respectivement).

Tableau 3 : Sondes apoptotiques appliquées à la MECF en pneumologie

Sonde	Couleur	Cible	Organisme	Contexte	Référence
YO-PRO-1	Vert	Fragmentation de l'ADN	Brebis	Régression de corps jaune	(Al-Gubory, 2005)
FLIVO	Vert	Caspases	Souris C57BL/6	Apoptose des hépatocytes	(Goetz et al., 2010)
NucView® 488	Vert	Activité Caspase 3	Souris nude	Implantation hétérotopique sous-cutanée	(Guisier et al., 2017)

Dans les articles de Al-Gubory et de Goetz et al., le mécanisme par lequel les sondes détectent la mort cellulaire n'est pas adéquat et l'analyse des images est limitée à des observations qualitatives. Pour détecter les cellules apoptotiques, la sonde FLIVO inhibe les caspases, ce qui implique qu'une différence n'est détectable que dans un contexte d'apoptose tardive. La sonde YO-PRO-1 permet de visualiser la dégradation de l'ADN qui est aussi un événement tardif de l'apoptose. Au meilleur de nos connaissances, l'article de Guisier est le seul où il y a la quantification de l'activité apoptotique *via* des images acquises par MECF en ciblant l'activité de la caspase 3. L'acquisition des images a été réalisée *ex vivo* dans un modèle d'implantation hétérotopique sous-cutanée.

Ce projet a pour objectif de valider l'utilisation d'une sonde caspase 3 par MECF, mais aussi d'explorer la possibilité de visualiser cette activité au niveau pulmonaire *in vivo* par voie endoscopique. Afin d'ajouter de la force à la preuve de concept, les résultats obtenus par MECF doivent être comparables à ceux obtenus en histologie, ce qui n'a pas non plus été fait dans l'article de Guisier et al. Finalement, la sonde caspase 3 doit émettre de la fluorescence dans le NIR, une plage de longueur d'onde où l'autofluorescence des tissus est faible, afin d'obtenir le meilleur contraste possible.

Structure moléculaire des sondes expérimentales

Les sondes que nous utiliserons sont dotées d'un peptide de pénétration polycationique TAT, originaire du virus d'immunodéficience humaine 1 (Ziegler et al., 2005). Ces peptides sont largement utilisés afin d'acheminer diverses molécules exogènes (peptides, siARN, agent chimiothérapie) (Cerrato et al., 2014). Ils se lient à la membrane et pénètrent dans la cellule soit par diffusion, par endocytose, ou par les cargos et, bien que ces peptides soient dirigés vers le noyau, ils se retrouvent éventuellement dans le compartiment cytosolique où se retrouve la caspase 3 active (Vivès et al., 2003).

La séquence d'acides aminés DEVD est l'élément qui donne à la sonde sa spécificité à l'activité de la caspase 3 ce qui permet de séparer le peptide de perméation cellulaire (CPP) et de Q (QSY21) du fluorophore (F). Ces acides aminés sont naturels (ayant une conformation stéréochimique L) ce qui permet d'être reconnue et clivée par la caspase 3 et de réduire le risque que la sonde soit clivée par une autre protéase, puisque les acides aminés du peptide TAT sont non naturels.

L'enjeu est que nous avons des sondes peptidiques qui ciblent l'activité d'une protéase, la caspase 3, mais qui doit aussi être à l'abri de l'activité protéolytique des autres peptidases plasmatiques. C'est pourquoi le peptide TAT que nous avons utilisé est riche en D-lysine, un isomère non naturel, afin d'éviter la dégradation par les protéases plasmatiques (Copolovici et al., 2014; Maluch et al., 2019). Les peptides de pénétration riches en arginines sont plus efficaces que ceux riches en lysine, mais sont cependant plus toxiques (Bechara et al., 2013). La figure 10 montre la structure des sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen} et la figure 11 illustre le mécanisme d'activation des sondes.

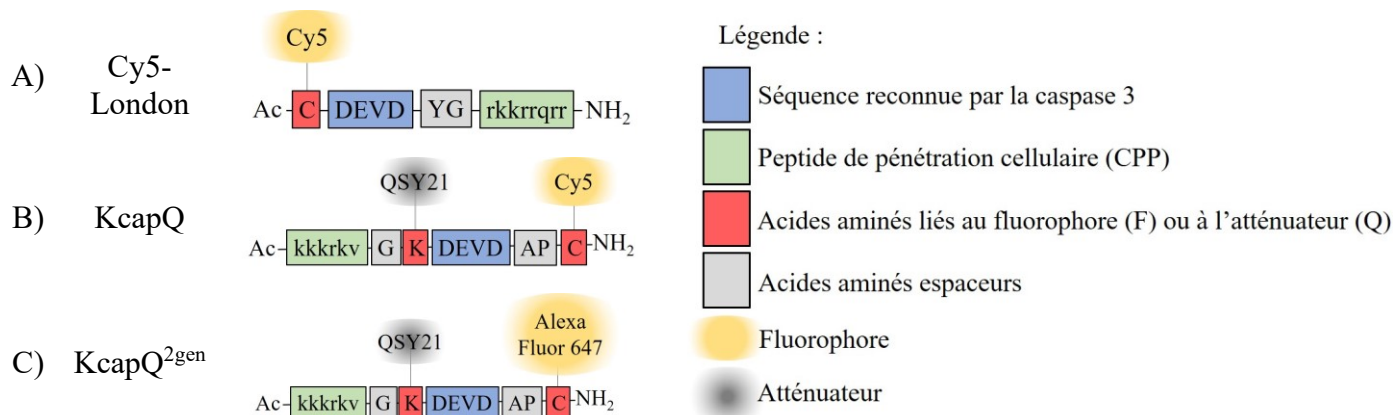


Figure 10 : Structure moléculaire des sondes

Toutes les sondes sont dotées d'un squelette peptidique qui comprend un peptide de pénétration cellulaire (CPP) composé d'acides aminés non naturels (vert), d'une séquence peptidique reconnue par la caspase 3 (bleu), d'espaceurs (gris) et d'acides aminés qui lient le fluorophore (F) et, le cas échéant, l'atténuateur (Q). **A)** La sonde Cy5-London n'est pas dotée d'un Q contrairement à KcapQ et KcapQ^{2gen}, qui possèdent un QSY 21 (**B** et **C**). Les fluorophores Cy5 et Alexa Fluor 647 sont liés à la cystéine par un lien sulfomaleimide. Le Q est lié à la lysine par un lien amide.

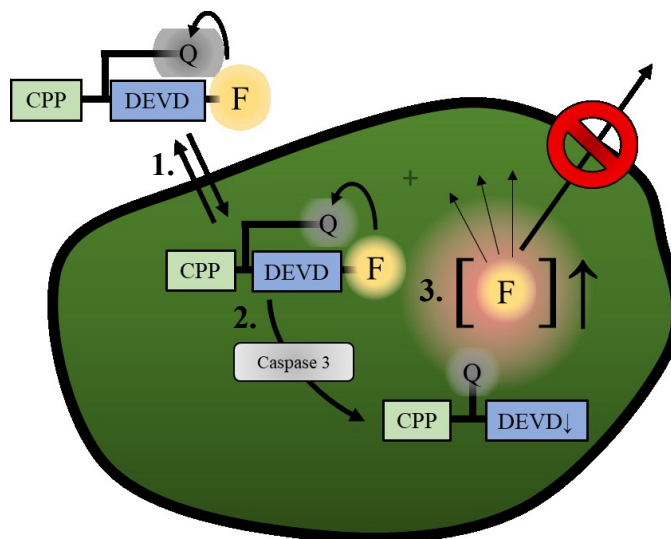


Figure 11 : Mécanisme d'activation des sondes

La structure des sondes est composée d'un CPP de type TAT, de la séquence peptidique -DEVD- reconnue par la caspase 3, de QSY21 (Q) et d'un fluorophore (F). La structure de la sonde Cy5-London est similaire, mais n'est pas munie de Q. Cy5-London et KcapQ possèdent Cy5 comme F, tandis que KcapQ^{2gen} possède Alexa Fluor 647. La sonde est internalisée dans la cellule par le biais du CPP (1) et la caspase 3 clive le lien entre le résidu D et le F (2). Ce clivage sépare le F du CPP et de Q dans le cas d'une sonde activable. À la suite du clivage, le F ne peut plus passer la membrane et s'accumule dans le cytosol de la cellule en apoptose (3).

La MECF : l'imagerie moléculaire au chevet du patient

En clinique, il y a plusieurs marqueurs biochimiques permettant d'évaluer l'état physiopathologique d'un patient, mais ces marqueurs doivent être utilisés sur des tissus prélevés. Chez les patients présentant un SDRA ou un CPNPC, ce prélèvement se fait par biopsie qui demeure la pierre angulaire pour poser un diagnostic précis qui va orienter au mieux la prise en charge du patient. Cela requiert du temps qui est critique compte tenu de l'état de certains patients aux soins intensifs, mais est aussi invasive et mobilise beaucoup de ressources. La biopsie ne peut pas toujours être réalisée plusieurs fois chez un même patient, ce qui ne permet pas de faire de suivi. L'objectif ultime de ce projet est qu'il soit possible d'administrer des marqueurs biochimiques fluorescents directement chez le patient et par une endoscopie combinée au MECF, de poser un diagnostic qui va orienter la prise en charge de ce patient rapidement, de façon non invasive, ce qui évitera d'avoir recours à une biopsie. Le développement de cette modalité d'imagerie constitue une grande étape dans le développement de la médecine personnalisée, car l'imagerie moléculaire en direct permettra de connaître la situation pathologique de chaque individu et d'adapter la prise en charge en fonction de chaque besoin.

Hypothèse/problématique

Une ou plusieurs sondes qui ciblent l'activité de la caspase 3 sont spécifiquement activables et utilisables *in vivo* pour mesurer l'activité en cinématique cellulaire correspondant.

Objectifs**Objectif #1**

Validation *in vitro*. Montrer que les sondes expérimentales sont activées préférentiellement par la caspase 3 recombinante.

Objectif #2

Validation *in cellulo*. Déterminer s'il est possible de détecter les cellules apoptotiques en culture par le biais des sondes expérimentales.

Objectif #3

Validation *in vivo*. Montrer la faisabilité d'observer une activité apoptotique par MECE par voie endoscopique chez un modèle inflammatoire et d'implantation orthotopique de cancer pulmonaire chez le rat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette section se divise en 4 parties. La première partie est consacrée au dosage des sondes expérimentales suite à la synthèse, puis à l'extraction et à la purification de la caspase 3 recombinante. La deuxième partie décrit comment les essais *in vitro* ont été réalisés, c'est-à-dire les essais enzymatiques avec les différentes caspases recombinantes et les sondes KcapQ, KcapQ^{2gen} et Cy5-London. La troisième partie *in cellulo* décrit la méthode qui a permis d'élaborer le modèle cellulaire apoptotique et comment les sondes expérimentales ont été testées avec ce modèle. Finalement, la quatrième et dernière partie se concentre sur la validation *in vivo*, plus précisément sur l'élaboration du modèle d'implantation orthotopique, la validation du succès de l'implantation et le test des sondes expérimentales visualisées par MECF.

Dosage des sondes

Les sondes expérimentales (Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen}) ont été dissoutes dans du DMSO à une concentration théorique de 1 à 3 mM, selon la quantité de sondes obtenue lors de la synthèse. Par la suite, elles ont été diluées dans du MeOH 100 % sur glace à des dilutions de 1 :3000, 1 :1500 et 1 :750. Les échantillons ont été déposés dans des cuvettes de quartz et le spectre d'absorbance a été mesuré par spectrophotométrie (Hitachi U-2010) sur une plage de 500 à 675 nm. La valeur d'absorbance mesurée à 649 nm a été utilisée pour calculer la concentration. Le blanc (le MeOH 100 % sur glace) a été soustrait directement par le logiciel d'acquisition (UV Solutions version 1.2, Hitachi High-Technologies Corporation). La concentration a été calculée avec la loi de Beer-Lambert.

$$\text{Équation 2 : } A = \epsilon cl$$

Où :

A est la valeur d'absorbance

ϵ est le coefficient d'extinction molaire de Cy5 dans le méthanol (250 000 cm⁻¹)

c est la concentration en fluorophore (μM).

l est le chemin optique (1 cm).

Expression, purification et caractérisation de la caspase 3 recombinante

Cette première section s'intéresse à la purification et à la caractérisation de la caspase 3 recombinante uniquement puisque c'est son activité qui est ciblée par nos sondes expérimentales. Plusieurs purifications de lots de caspase 3 ont été nécessaires pour mener à bien ce projet puisqu'elle a été très utilisée pour optimiser les protocoles. Les autres caspases (2, 6, 7, 8 et 10) étaient déjà purifiées par la même méthode avec des modifications minimales et ont gracieusement été données par le professeur Jean-Bernard Denault de l'institut de pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke.

Voici la liste des différents produits récurrents qui constituent les tampons : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique, N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique) (HEPES, Sigma), Citrate sodique (Fischer Chemical), Chlorure de sodium (NaCl, EMD Millipore), (3-((3-cholamidopropyl)-diméthylammonio)-1-propanesulfonate) (CHAPS, EMD Millipore), Dithiothréitol (DTT, Sigma), Hydroxyde de sodium/acide chlorhydrique (NaOH/HCl, Fischer Millipore), Acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique, acide pipérazine-1,4-bis(2-éthanesulfonique), acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique) (PIPES, Sigma), Acide Éthylènediaminetétraacétique (EDTA, Sigma).

Expression et purification sur colonne

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3)pLysS (Novagen) ont été propagées dans du milieu de culture TY contenant 100 µg/mL d'ampicilline. La transformation des bactéries a été réalisée avec le plasmide pET-23b(t) de Novagen (Stratagene) contenant une séquence d'ADN du gène *CASP3*. Ce gène *CASP3* code pour la caspase 3 pleine longueur avec une séquence polyhistidine en C-terminal essentielle pour la purification sur colonne chromatographique. L'expression du gène *CASP3* et la transcription de la protéine a été induite par l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (BioBasic) à 200 nM pendant 6 h durant la phase de croissance logarithmique des bactéries. Par la suite, les bactéries ont été suspendues dans du tampon de suspension (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM) et congelées à - 80 °C pour la nuit. Le lendemain, les suspensions ont été décongelées à 37 °C et lysées par sonication (Digital Sonifier 450, BRANSON) pour 30 cycles à des intervalles de 0,5 s, puis centrifugées 30 min à 18 000 g à 4°C. Avant la purification, la résine a été lavée 5 fois avec de l'eau Milli-Q, puis 2 mL de solution à 100 mM de sulfate de nickel (NiSO₄) par mL de résine ont été ajoutés. Par la suite, la colonne a été équilibrée avec du tampon de

suspension (5 fois le volume de résine) à 4 °C pour finalement verser le lysat préalablement filtré par gravité. La colonne a été lavée 10 fois avec du tampon de lavage stérilisé par filtration (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM). Le surnageant a été filtré sous vide avec un filtre 0,45 µm (Stericup et Steritop, Durapore, Millipore). Le filtrat a été purifié sur une colonne de Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare). Le volume attendu de résine a été ajouté de façon à obtenir un ratio de 1 mL de résine pour 2 à 5 mg de protéine. L'élution a été effectuée avec un tampon contenant de l'imidazole (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, 200 mM d'imidazole). L'éluat a été récupéré et séparé en fractions par chromatographie liquide rapide de protéine (FPLC) munie d'un détecteur UV (ÄKTAprime plus, Healthcare Life Sciences). Les 9 fractions impaires montrant une forte absorbance aux UV (280 nm) ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE 12 % et coloration au bleu de Coomassie (GelCode Blue, Thermo Scientific). Pour confirmer la présence et la pureté de la caspase 3, les bandes ont été validées par une échelle moléculaire *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio Rad). Les fractions obtenues par FPLC qui montrent une absorbance à 280 nm supérieure ont été réunies pour créer le lot de caspase 3. Ce lot a ensuite été titré avec un inhibiteur irréversible.

Titration de la caspase 3 recombinante

La quantité de protéine a été estimée par le biais de la plateforme web ExPASy (Gasteiger et al., 2003), puis la solution a été diluée à une concentration théorique de 200 nM avec du tampon caspase exécitrice 1X (PIPES 10 mM pH 7,2, NaCl 100 mM, sucrose 10 % w/v, CHAPS 0,1 % w/v, EDTA 1 mM et DTT 10 mM fraîchement ajouté). Cette dilution a incubé 10 min à 37 °C afin d'activer la caspase 3. Par la suite, dans une plaque 96 puits, la solution d'inhibiteur irréversible des caspases, l'inhibiteur carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-fluorométhylcétone (Z-VAD-FMK, Enzo Life Sciences) a été dilué 2 :1 dans du tampon exécitrice dans une plaque 96 puits transparente afin d'obtenir des concentrations finales lors des essais de 0 à 2 µM. La caspase 3 a été ajoutée au Z-VAD-FMK à une concentration finale théorique de 100 nM puis incubée 30 min à 37°C. Finalement, le substrat de la caspase 3 colorimétrique Ac-DEVD-pNitroaniline (Ac-DEVD-pNa, Cayman Chemical) a été ajouté à une concentration finale de 400 µM. Immédiatement après l'ajout du substrat, la plaque a été placée dans un spectrophotomètre (Infinite M1000, TECAN) et l'absorbance à 405 nm a été mesurée pendant 3 h à des intervalles de 15 s. Une régression

linéaire a été effectuée sur la courbe absorbance/temps pour chaque concentration d'inhibiteur, mettant en relation la vitesse initiale de clivage (v_0) en fonction de la concentration d'inhibiteur. L'abscisse à l'origine représente la concentration de site actif effectif.

Études *in vitro*

Activation des caspases recombinantes

Les caspases recombinantes ont été préincubées à une concentration de 200 nM dans du tampon de réaction préchauffé à 37°C. Pour les caspases 3, 6 et 7, du tampon de réaction exécutive a été utilisé (PIPES 10 mM pH 7,2, NaCl 100 mM, sucrose 10% w/v, CHAPS 0,1% w/v, EDTA 1 mM et DTT 10 mM fraîchement ajouté). Pour les caspases initiateuses 8, 9 et 10, du tampon de réaction initiateur 1X a été utilisé (HEPES 50 mM pH 7,2, citrate sodique 1 M, NaCl 50 mM, CHAPS 0,01 % w/v et DTT 10 mM fraîchement ajouté). Les caspases initiateuses ont été préincubées pendant 1 h. Les caspases exécutives 3 et 7 ont été préincubées 10 min. Le tout a été réalisé dans un incubateur humide à 37°C.

Caractérisation de KcapQ et KcapQ^{2gen}

KcapQ à une concentration de 20 μ M a été incubée avec 12 nM de caspases recombinantes 3, 7, 8 ou 10. La fluorescence a été mesurée à des intervalles de 2 min pendant 60 min à des longueurs d'onde $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 650/670 nm et à un gain de 85. La vitesse initiale (v_0) a été déterminée en calculant la pente de 0 à 10 min. KcapQ^{2gen} a été incubée à une concentration de 10 μ M avec 3 nM de caspase 3 recombinante. La fluorescence a été mesurée à des intervalles de 68 s pendant 3 h à des longueurs d'onde $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 650/680 nm et à un gain de 60. La v_0 a été déterminée en calculant la pente de la cinétique au complet. Pour les deux sondes, la v_0 a été divisée par la concentration d'enzyme afin de comparer leur cinétique. Les deux sondes ont été incorporées au dernier moment avec les enzymes préactivées, immédiatement avant le début de la prise des mesures avec le spectrophotomètre à 37 °C (Infinite® F200, TECAN).

Évaluation de la cinétique enzymatique de Cy5-London

La fluorescence de la sonde Cy5-London n'étant pas affectée par le clivage de la sonde, nous avons évalué trois méthodes afin de déterminer la présence de l'espèce clivée en solution. Durant et après la réaction avec l'enzyme, de petits volumes du milieu réactionnel étaient prélevés et analysés.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des tubes contenant 40 μ L de MeOH 100 % froid, conservés sur glace, ont été préparés pour arrêter la réaction. Le milieu réactionnel était composé de la sonde à 10 μ M et de caspase à 5 nM. La réaction a été arrêtée par un transfert de 10 μ L de milieu réactionnel dans un tube contenant 40 μ L de MeOH 100 % froid à des temps se situant de 0 à 55 min. Par la suite, 1 μ L de la solution stoppée au MeOH a été déposé sur une plaque de silice sur support de verre (EMD Millipore). Une élution a été réalisée avec une solution AcONH_4 à pH 5,5 (Fischer Scientific) jusqu'à ce que le front de migration ait atteint le 3/4 de la hauteur de la plaque. Celle-ci a, par la suite, été séchée avec de l'air comprimé. La plaque a été révélée par imagerie à fluorescence planaire (Optimus) à un temps d'exposition de 5 s et à une intensité de 50 %.

Essai à la fluorescamine

La fluorescamine (4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dione) (Sigma) a été dissoute à 3 mg/mL dans du DMSO. Un volume de 20 μ L de MeOH 100 % froid a été déposé dans une plaque noire 384 puits pour l'arrêt des réactions. La plaque a été conservée sur glace avec un couvercle et une membrane de paraffine. Une solution de sonde Cy5-London a été préparée à 50 μ M dans du tampon de caspase initiateur ou exécuteur (selon la caspase avec laquelle elle était incubée). Cette solution a été préchauffée à 37 °C pendant 5 min. Cy5-London et les caspases recombinantes préalablement activées ont été combinées et incubées à 37 °C pour une concentration de 5 nM de caspase. La réaction a été stoppée à différents temps se situant entre 0 et 60 min par un transfert de 5 μ L de milieu réactionnel dans la plaque contenant 20 μ L de MeOH 100 % froid, préalablement déposé. La fluorescamine à 3 mg/mL a été ajoutée à ces puits pour une concentration finale de 1 mg/mL. Le tout a été incubé à température de la pièce (TP) pendant 45 min, protégé de la lumière. L'intensité de la

fluorescence a été mesurée au spectrofluoromètre ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 384/482$ nm, gain = 85). Le blanc contenait du MeOH 100 % froid ainsi que du tampon de caspase exécitrice ou initiatrice.

Chromatographie en phase liquide ultra-performance et spectrométrie de masse (UPLC-MS)

Une solution de sonde Cy5-London a été préparée à 90 μM dans du tampon caspase exécitrice 1X + DTT fraîchement ajouté. La concentration de caspase 3 incubée avec la sonde était de 2 nM. La réaction entre Cy5-London et la caspase 3 a été arrêtée par une dilution 1:2 dans un mélange H₂O/acétonitrile (ACN) 1 :1 aux temps 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 et 15 min. Une fois la réaction interrompue, les solutions ont été filtrées avec une membrane de nylon 0,22 μm (SiliCycle) puis déposées dans une fiole HPLC. Les échantillons ont été injectés dans l'appareil UPLC-MS (Acquity H-Class UPLCMS, Waters, Canada) et séparés par le biais d'une colonne apolaire CSH C18 (50 x 2,1 mm, particule sphérique à 1,7 μm de diamètre, Waters, Canada) et d'une phase mobile à un flux de 0,8 mL/min pour 2,5 min par gradient, composé à 0,1 % v/v d'acide formique et d'un ratio variable d'ACN (5 à 95 %) dans l'eau. Le gradient de la phase mobile varie comme suit : 12 s à 5 % d'ACN, augmentation jusqu'à 95 % en 78 s, maintien pendant 1 s à 95 % d'ACN, diminution jusqu'à 5 % en 12 s et enfin maintien pendant 30 s à 5 % ACN. Le spectromètre de masse a détecté la masse de Cy5-London non clivée pentachargée $(M+5H)/5 = 586,2$ où $M = 2972,34$ Da, $\text{Tr} = 0,94$ min. La quantification a été réalisée par le biais d'un standard interne de nicotinamide (Sigma). La nicotinamide monochargée a été détectée $(M+1H)/1 = 123,12$ où $M = 122,12$ Da, $\text{Tr} = 0,28$ min. Sur le chromatogramme, l'aire sous la courbe (ASC) correspondant aux pics de Cy5-London pentachargée ($\text{ASC}_{\text{Cy5-L}}$) et de la nicotinamide monochargée ($\text{ASC}_{\text{Nicot}}$) a été mesurée et le rapport entre ces aires ($\text{ASC}_{\text{Cy5-L}}/\text{ASC}_{\text{Nicot}}$) a été calculé pour la quantification de Cy5-London non clivée. La linéarité entre le signal et la concentration des deux substances (Cy5-London et nicotinamide) a été confirmée et les concentrations utilisées ont été choisies en fonction du rapport $\text{ASC}_{\text{Cy5-L}}/\text{ASC}_{\text{Nicot}}$, qui donne la plus petite variance et qui ont demandé le moins de sondes possible.

Études *in cellulo*

Cette partie montre dans un premier temps la méthode employée pour élaborer le modèle cellulaire apoptotique présentant une activité de la caspase 3. Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées et plusieurs inducteurs ont été testés. L'activité de la caspase 3 a

été validée par essai colorimétrique, par FACS et par microscopie à épifluorescence par le biais de différents marqueurs fluorescents commerciaux qui ciblent soit l'activité de la caspase 3 ou la perte de $\Delta\Psi_m$. Dans un deuxième temps, cette section montre comment les sondes expérimentales, KcapQ, KcapQ^{2gen} et Cy5-London ont été testées chez ce modèle cellulaire apoptotique préalablement établi.

Culture des cellules et induction de l'apoptose

Les lignées cellulaires utilisées ont été les cellules HeLa, (col utérin humaine, gracieuseté de la Pre Lee Hwa Tai du Département d'anatomie et de biologie cellulaire de l'Université de Sherbrooke), les cellules A549 et leur version GFP (CPNPC humain, provenant de l'ATCC) ainsi que les cellules H1299 et leur version GFP (CPNPC humain, provenant de l'ATCC). Les lignées HeLa, A549 et A549-GFP ont étéensemencées dans du milieu RPMI (Wisent Inc.), tandis que les lignées H1299 et H1299-GFP ont étéensemencées dans du milieu de culture EMEM (Wisent Inc.). Tous les milieux étaient complets (10 % FBS, 5 % glutamine, 5 % streptomycine et de pénicilline (Wisent Inc)). Les cellules étaient cultivées jusqu'au passage 20 au maximum. À moins d'autre mention, toutes les incubations ont été réalisées à 37 °C et 5 % CO₂. Pour les manipulations, les cultures ont étéensemencées de façon à obtenir une confluence de 80 % 24 h après l'ensemencement. À ce moment, elles ont été induites en apoptose par un traitement, soit à la staurosporine (STS, Abcam) de 0,2 à 5 µM pendant 2 à 6 h, soit aux UV à une dose de 100 J/m² et cultivées 48 h ou au 5-Fluorouracile (5-FU, Sigma) à 100 µM pendant 48 h. Pour l'irradiation aux UV, le milieu a été retiré avant la mise en place de la culture dans l'appareil (Spectrolinker XL-1000, Spectronic corporation), puis le même milieu a été remplacé par la suite. Dans les contrôles appropriés, l'activité des caspases a été inhibée par une pré incubation de 1 h avec le Z-VAD-(OMe)-FMK (Abcam) à une concentration de 10 ou 50 µM. L'inhibiteur de caspase a été laissé dans le milieu pour le reste de l'expérience.

Cytométrie en flux (FACS)

Les cellules ont été induites en apoptose telle que mentionnée au paragraphe précédent, puis incubées avec les sondes expérimentales (Cy5-London et KcapQ) à des concentrations de 0, 10, 30 ou 100 nM pendant 0, 30 ou 120 min. La sonde KcapQ^{2gen} a, quant à elle, été testée à une concentration de 100 nM pendant 120 min. Par la suite, les cellules ont été

détachées au Versene (Gibco) puis incubées avec un autre marqueur d'activité de la caspase 3, soit CellEvent™ (Invitrogen, ThermoFisher) ou NucView® 488 à 0,1X (Biotium) pendant 30 min à TP. La perte de $\Delta\Psi_m$ a été mesurée par le marqueur lipophile cationique JC-10 (Abcam). JC-10 existe sous deux formes : la forme agrégée émet une fluorescence orange ($\lambda_{em} = 595$ nm) après avoir pénétré la mitochondrie et la forme monomérique émet une fluorescence verte ($\lambda_{em} = 525$ nm) dans le compartiment cytosolique. S'il y a perte de $\Delta\Psi_m$, JC-10 ne pénètre pas la mitochondrie et la fluorescence à 525 nm sera prédominante. Pour le marquage, les cellules ont été détachées au Versene et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 min à TP. Le surnageant a été retiré et la culture a été incubée avec le tampon inclus dans le matériel JC-10. Le contrôle positif JC-10 consiste en une incubation avec le carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP, Sigma), un agent découpleur de la chaîne respiratoire mitochondriale, à 20 μ M pendant 30 min afin d'induire une perte de $\Delta\Psi_m$. La mort cellulaire a été contrôlée par un marquage au SYTOX AADvanced (7-AAD, Biotium) 0,01X. Le contrôle positif pour le 7-AAD consistait en une incubation avec la saponine (ACROS organics), un agent perméant, à 0,05 % w/v pendant 20 min à TP. Ce témoin positif permettra d'identifier et d'exclure les cellules mortes. Les suspensions ont été analysées, soit par le lecteur de plaque automatique ou le lecteur de tubes Cytoflex (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Les fluorochromes ont été excités par les lasers à 488 ou 660 nm (diodes 50 mW) et détectés par différents canaux; JC-10 (PE 585/42 et FITC 525/40), NucView® et CellEvent™ (FITC 525/40), 7-AAD (PC5 690/50) et les sondes expérimentales dans le proche infrarouge (APC 660/20). Les données acquises ont été analysées avec le logiciel CytExpert 2.0. Les signaux Side Scattering Signal-Area (SSC-A) et Forward Scattering Signal-Area (FSC-A) ont permis de distinguer les débris et les amas qui ont été exclus de l'analyse. Les doublets cellulaires ont été exclus *via* le signal SSC-Width. Pour le marqueur JC-10, le ratio de l'intensité du signal (I) du canal FITC (I_{FITC}) sur le canal PE (I_{PE}) a été calculé et normalisé par rapport au contrôle non induit en apoptose. Pour CellEvent™, NucView® et les sondes expérimentales (KcapQ, KcapQ^{2gen} et Cy5-London), le pourcentage de cellules positives pour chacun des marqueurs a été mesuré. Le marquage non spécifique a été déterminé par le contrôle non induit en apoptose.

Essai colorimétrique

À la suite des traitements, le milieu a été retiré et 2 mL de PBS 1X chauffé à 37 °C ont été ajoutés. Les cellules ont été suspendues au grattoir puis la suspension a été centrifugée 5 min à 1800 rpm. Le surnageant a été retiré et les culots ont été congelés à – 80 °C pour la nuit. Le lendemain, les culots ont été incubés sur glace dans du tampon de lyse (Abcam, ab39401) et ont été mélangés au vortex aux 10 min pendant 30 min. Par la suite, les solutions de lyse ont été centrifugées à 10 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été transféré et la quantité de protéine a été dosée par la méthode de Bradford (kit Bio-Rad) à l'aide d'une courbe standard d'albumine sérique bovine (Sigma) de 0 à 500 µg/mL. Les lysats cellulaires ont ensuite été déposés dans une plaque 96 puits et dilués dans du tampon caspase exécitrice 1X + DTT fraîchement ajouté. Le substrat de la caspase 3 colorimétrique, l'Ac-DEVD-pNa (Cayman Chemical) a été ajouté dans les lysats à une concentration de 200 ou 400 µM. La quantification de l'activité de la caspase 3 a été réalisée en incubant 100 µg de protéine avec un substrat colorimétrique. L'activité relative entre les échantillons était ensuite calculée, soit basée sur l'absorbance à 405 nm après 2 h d'incubation, ou en calculant la pente initiale de la cinétique de cette réaction, normalisée par rapport à la quantité de protéines dans l'échantillon. Pour cet essai, un spectromètre différent a été utilisé (THERMOmax, Molecular Devices).

Microscopie épifluorescence

Les cellules A549 et H1299 ont été induites en apoptose par 1 µM de STS dans une plaque 6 puits contenant une lamelle de verre au fond. CellEvent™, le marqueur de l'activité de la caspase 3, a été ajouté dans le milieu de culture à la quantité spécifiée par le fabricant pendant 30 min. Les sondes KcapQ et Cy5-London ont été incubées à une concentration de 100 nM pendant 2 h. Le milieu de culture a été aspiré et remplacé par du PBS stérile. Les lamelles ont été montées dans du milieu de montage contenant du DAPI à 300 nM (Invitrogen) dans du PBS. Le tout a été déposé sur une lame à microscopie et scellé au vernis. Les images ont été acquises la même journée à la microscopie épifluorescence (Zeiss Axioskop 2) à un objectif 40x. CellEvent™ a été détecté par le filtre d'émission à 560/40 nm, le DAPI par le filtre 480/30 nm et les sondes Cy5-London et KcapQ avec le filtre 645/50 nm. Les images ont été visualisées par le logiciel ImagePro.

Microscopie confocale

Les cellules H1299 ont étéensemencées dans une boîte de Pétri de 35 mm avec fond de verre (MatTek) à une confluence de 80 %. L'apoptose a été induite par une incubation avec la STS 2 μ M pendant 4 h, 37°C, 5 % CO₂. Les cellules ont été incubées à l'abri de la lumière avec le Hoesch (Thermofischer) à 10 μ g/mL pendant 30 min. Les cultures ont été placées dans la chambre environnementale chauffée à 37 °C du microscope confocal inversé FV1000 (Olympus, Tokyo, Japon). La sonde KcapQ a été ajoutée immédiatement avant l'acquisition des images à une concentration de 0,5 μ M. Les images ont été acquises avec l'objectif 60x NA 1.42 avec de l'huile à immersion. Le Hoesch a été excité par le laser 405 nm (diode 50 mW) et détecté sur une bande passante de 500-530 nm. La sonde KcapQ a été excitée par le laser à 632,8 nm (hélium-néon rouge 10 mW) et détectée par le détecteur à 650 nm à large bande passante. Les images ont été acquises sur 5 champs de vue aux 2 min pendant 2 h. Les images ont été visualisées par le logiciel FluoView (Olympus, version 4.2).

Expérimentations in vivo

Cette section se divise en deux sections. La première explique comment nous avons procédé pour élaborer et caractériser nos modèles animaux. La deuxième section présente les procédures d'imagerie par TDM, pour valider le succès de l'implantation orthotopique du modèle CPNPC, et par MECF, pour imager en temps réel les voies aériennes des animaux auxquels nous avons préalablement administré les sondes expérimentales.

Traitements des animaux

Les rats ont été traités selon les lignes directrices du *manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation*, du conseil canadien de la protection des animaux. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la protection des animaux de l'Université de Sherbrooke. Les animaux avaient accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. L'éclairage était programmé pour fournir un cycle de lumière de 12 h de jour et 12 h de nuit. Les animaux étaient sous anesthésie avant d'entreprendre les expériences (l'élaboration des modèles, l'administration de la sonde expérimentale et l'acquisition des images par MECF et TDM). L'anesthésie a été réalisée par injection intramusculaire de 200 μ L de kétamine et de xylazine (CDMV) à 87 et 13 mg/mL, sauf lors de l'imagerie par TDM où l'anesthésie a été induite à l'isoflurane (induction à 2,5%, maintien à 1,5 % ajusté lorsque nécessaire).

Modèle inflammatoire

Le LPS (Sigma) a été instillé en intrapulmonaire (Microsprayer®, Penn-Century) à une dose de 3 mg/kg chez des rats adultes Sprague-Dawley (Charles River) pour induire l'inflammation localement dans le poumon. Le LPS simule le stade aigüe de l'ARDS et induit l'apoptose chez les cellules PMN, les macrophages et les pneumocytes (Z'graggen et al., 2010). L'acquisition des images par MECF a été réalisée 18 h après l'administration de la sonde expérimentale.

Modèle d'implantation orthotopique

Le modèle CPNPC a été réalisé chez des rats juvéniles nus monozygotes (Charles River). Afin d'augmenter le rendement de l'implantation, les cellules H1299-GFP (Creative Biogene) ou A549-GFP ont été administrées par deux voies d'administration avec une aiguille 32-G. La voie transcostale intrathoracique entre les côtes 5 et 6 a été utilisée pour connaître la localisation approximative d'au moins une tumeur et la voie i.v. par la veine jugulaire a été utilisée afin de disséminer les cellules dans le poumon et augmenter la charge de cellules cancéreuses.

Les cellules ont étéensemencées dans du milieu sans phénol et ont été détachées par trypsinisation (Wisent Inc) et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 min. Le milieu de culture a été retiré et les culots ont été suspendus pour un nombre de 4×10^6 cellules dans un volume de 100 μ L d'un mélange de matrigel (Sigma) et de milieu EMEM ou RPMI à un ratio volumique 1:1 puis ont été administrée chez les rats tel qu'il est mentionné ci-dessus. Certains rats ont été traités au cisplatine (Sigma) 4 semaines plus tard par pompe osmotique (Alzet) à 4,5 mg/kg i.p. pendant 2 semaines. La validation de l'implantation a été réalisée *in vivo* par imagerie TDM et *ex vivo* par observation macroscopique, par le MECF et par un marquage à l'hématoxyline et à l'éosine réalisée par le service d'histologie et de microscopie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

Imagerie

Tomodensitométrie

Durant la TDM, les signes vitaux (respiration, température) des animaux ont été surveillés grâce à une plateforme PC-sam (Small Animal Instruments Inc). La température a été maintenue à plus de 34 °C à l'aide d'un lit chauffant. L'animal a été déplacé vers la section

TDM de l'appareil, et une acquisition TDM a été effectuée avec les paramètres suivants : Magnification 2,20; Voltage : 60 kVp; taille de la matrice de données reconstruite: 512 x 512 x 512; Résolution spatiale : 0,178 mm isotropique. Les données ont été reconstruites sur un serveur interne du centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke de la Faculté de médecine et des sciences de la santé, roulant un algorithme développé par M. Christian Thibodeau (IR&T, CTdaemon web service).

Microendoscopie confocale par fluorescence (MECF)

Les images par microendoscopie ont été réalisées avec le CellVizio® (MaunaKea Technologies, Paris, France) muni d'une fibre optique Proflex S-1500 ou S-650 (Mauna Kea Technologies). Chaque vidéo dure en moyenne 1 min 30 s, et la séance d'imagerie complète dure en moyenne 10 min par animal. Les rats ayant été inoculés avec des cellules GFP ont été anesthésiés tels que mentionné précédemment et placé sur un lit de Plexiglas™ à une inclinaison de 45° en décubitus dorsal. Une trachéotomie a été réalisée pour y insérer une canule 14-G (diamètre interne de 2,2 mm) afin d'insérer la fibre optique. La sonde expérimentale Cy5-London a été administrée i.v. ou topique (intratrachéal) à une dose de 14 µg dans un volume de 250 µL de saline stérile 0,9 % 2 h avant l'acquisition des images. La raison de l'utilisation de ces deux voies d'administration est qu'à ce point, nous étions à nos premières tentatives pour imager la sonde Cy5-London *in vivo* par MECF. L'objectif de l'utilisation de deux voies d'administration a été d'explorer afin de savoir quel serait l'impact de ce paramètre au niveau de l'aspect des images acquises par MECF et peut-être donner un premier indice sur la voie d'administration optimale à emprunter. Les cellules GFP et la sonde ont été observées grâce aux deux canaux de détection du Cellvizio ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 488/505-650 nm et 660/680-900 nm, respectivement). À la fin de l'expérience, les animaux ont été euthanasiés par sectionnement de l'aorte abdominale et les poumons ont été prélevés. Des images *ex vivo* ont été acquises par MECF en plaçant directement la fibre optique sur une tumeur. Les poumons ont ensuite été remplis de composé de coupe à température optimale (OCT) et congelés à - 80 °C pour réaliser des cryo coupes au cryostat (Leica) à 9 µm d'épaisseur.

Analyses statistiques

Une grande partie de ce projet consiste à optimiser de nouvelles méthodes et d'élaborer des modèles cellulaires et animaux. La section *Résultats* montre le processus par lequel nous avons élaboré les modèles. La majorité des expérimentations ont été réalisées deux fois en duplicata. Cela signifie que la moyenne ne peut être calculée et aucun test statistique ne peut être réalisé. Le cas échéant, le test de Wilcoxon Mann-Whitney a été appliqué, car la petite taille de nos échantillons ne nous permet pas d'assumer que les variables sont distribuées selon une loi normale.

RÉSULTATS

Le projet consiste à caractériser des sondes fluorescentes qui ciblent l'activité de la caspase 3. Les candidates qui font l'objet de ce mémoire sont Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen}. La majeure partie de ce projet consistait à optimiser des modèles et à mettre en place une méthodologie adéquate. Comme dans la section *matériel et méthodes*, les résultats sont présentés en quatre parties, soit : 1) le dosage des sondes puis la caractérisation des caspases 3 recombinantes extraites, purifiées et titrées, 2) les expériences *in vitro*, 3) l'étude *in cellulo* et 4) les résultats préliminaires *in vivo*.

Dosage des sondes

À la fin de la synthèse, les sondes expérimentales sont lyophilisées et nous parviennent sous forme solide. Elles doivent être dissoutes à une certaine concentration, qui sera validée par dosage spectrophotométrique. De plus, le dosage permet de vérifier si les spectres d'absorbance sont constants entre chaque lot, ce qui donne un indice sur l'intégrité de la sonde. La figure 12 présente les spectres d'absorbance qui ont permis de doser les sondes. On voit sur les figures 12 A) et B) que les pics d'absorption de Cy5-London et KcapQ, qui se situe à 646 nm. Sur la figure 12 C), le pic d'absorption de KcapQ^{2gen} est décalé à 660 nm. Les tableaux 5, 6 et 7 montrent les valeurs obtenues lors de l'ensemble des dosages.

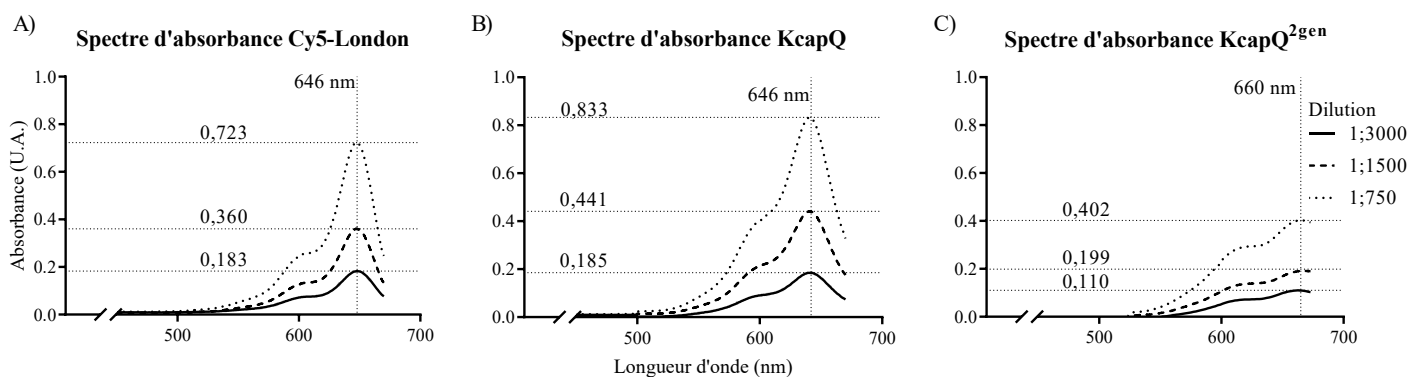


Figure 12 : Spectres d'absorbance des sondes moléculaires

Spectres d'absorbance des sondes diluées et mesurés dans le MeOH 100 %. Trois dilutions sont comparées (1 : 3000, 1 : 1500 ou 1 : 750). Les graphiques A, B et C correspondent aux spectres des sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen}, respectivement. L'absorbance du blanc (MEOH 100 %) est soustraite automatiquement par le spectrophotomètre U-1010. Le dosage est réalisé en triplicata, n = 1, pour chaque lot.

Tableau 4 : Dosage de la sonde expérimentale Cy5-London

Facteur de dilution	n	Absorbance 649 nm	Concentration (μM)	Concentration de la solution mère (mM)	Moyenne (mM)	Écart-type	Concentration utilisée (mM)
750	I	0,669	2,676	2,007	2,160	0,220	
	II	0,687	2,748	2,061			
	III	0,804	3,216	2,412			
1500	I	0,340	1,360	2,040	2,154	0,158	2,167
	II	0,348	1,392	2,088			
	III	0,389	1,556	2,334			
3000	I	0,176	0,704	2,112	2,188	0,142	
	II	0,175	0,700	2,100			
	III	0,196	0,784	2,352			

Tableau 5 : Dosage de la sonde expérimentale KcapQ

Facteur de dilution	n	Absorbance 649 nm	Concentration (μM)	Concentration de la solution mère (mM)	Moyenne (mM)	Écart-type	Concentration utilisée (mM)
750	I	0,748	2,992	2,224	2,231	0,011	
	II	0,742	2,986	2,226			
	III	0,741	2,964	2,223			
1500	I	0,398	1,592	2,388	2,378	0,028	2,206
	II	0,400	1,600	2,400			
	III	0,391	1,564	2,346			
3000	I	0,171	0,684	2,052	2,008	0,039	
	II	0,165	0,660	1,980			
	III	0,166	0,664	1,992			

Tableau 6 : Dosage de la sonde expérimentale KcapQ^{2gen}

Facteur de dilution	n	Absorbance 649 nm	Concentration (μM)	Concentration de la solution mère (mM)	Moyenne (mM)	Écart-type	Concentration utilisée (mM)
750	I	0,361	1,456	1,092	1,077	0,017	1,080
	II	0,360	1,440	1,080			
	III	0,353	1,412	1,059			
1500	I	0,167	0,668	1,002	1,004	0,015	
	II	0,165	0,660	0,990			
	III	0,170	0,680	1,020			
3000	I	0,094	0,376	1,128	1,160	0,037	
	II	0,100	0,400	1,200			
	III	0,096	0,384	1,152			

Caractérisation de la caspase 3 recombinante

Avant de réaliser la caractérisation *in vitro* de nos sondes expérimentales, nous devons produire et purifier nos caspases recombinantes. Nous travaillons avec des lots de caspase 3 provenant de colonies de bactéries *E.coli* transformées. La purification, qui a été réalisée sur une colonne par chromatographie d'affinité au nickel, doit être contrôlée et la concentration en site actif doit être titrée. La figure 13 A) montre comment les fractions obtenues aux UV sont sélectionnées afin de les regrouper pour former le lot de caspase 3 et d'en titrer l'activité. L'extrapolation de la zone linéaire sur la titration présentée sur la figure 13 B) (de 0 à 87,79 nM de Z-VAD-FMK) permet de calculer l'ordonnée à l'origine se traduisant en une concentration de 136,6 nM. Toutes les autres caspases mises à notre disposition ont déjà été caractérisées de la même façon par le laboratoire du Pr Jean-Bernard Denault de l'institut de pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke.

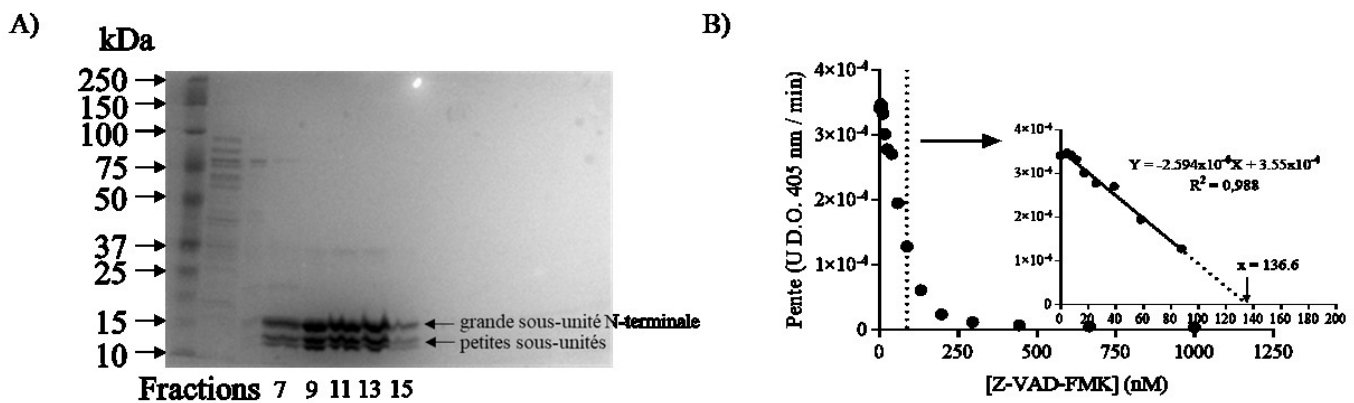


Figure 13 : Caractérisation de la caspase 3 recombinante

A) Gel électrophorèse SDS-PAGE 12 % réalisé à la suite de la purification de la caspase 3 recombinante. Les flèches pointent les petites et la grande sous-unité. B) le graphique montre les différentes pentes sur les cinétiques obtenues pour un essai d'inhibition. La zone délimitée de 0 à 87,79 nM est isolée pour faire la régression. Cette expérience a été réalisée en simplicata, $n = 1$.

Étude *in vitro*

L'objectif est de valider si les sondes expérimentales sont préférentiellement clivées par la caspase 3, notre cible d'intérêt pour imager l'apoptose. Cette partie consiste à réaliser des essais enzymatiques où les sondes KcapQ, KcapQ^{2gen} et Cy5-London ont été clivées par différentes caspases recombinantes.

***KcapQ* et *KcapQ*^{2gen}**

Puisque les sondes *KcapQ* et *KcapQ*^{2gen} sont munies d'un Q (QSY21), les essais *in vitro* consistaient à réaliser une cinétique enzymatique classique avec différentes caspases recombinantes. La valeur de fluorescence (u.a.) obtenue est soustraite du blanc (tampon de caspase initiateur ou exécuteur, dépendant de la caspase incubée avec la sonde). La pente initiale des cinétiques est calculée afin de déterminer la v_0 des sondes pour chaque enzyme. La figure 14 montre les cinétiques obtenues avec *KcapQ* clivée par les caspases 3, 7, 8 et 10 tandis que le tableau 7 montre les valeurs de v_0 . La caspase 3 clive mieux la sonde *KcapQ* comparativement aux caspases 7, 8 et 10.

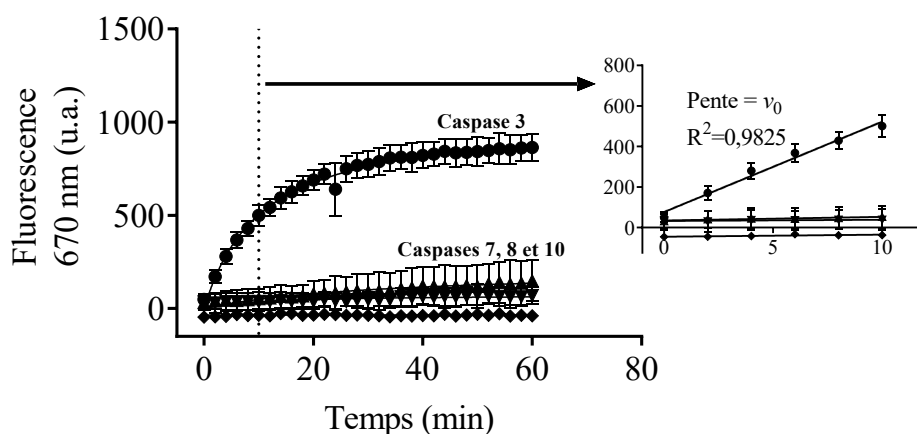


Figure 14 : Activation de *KcapQ* par les caspases recombinantes

Cinétiques obtenues avec différentes caspases (3, 7, 8 et 10) à 12 nM de site actif incubés avec *KcapQ* (20 μ M) pendant 60 min. La ligne verticale délimite les points utilisés pour calculer la v_0 . Ces points sont mis en évidence dans l'insert. L'essai est entrepris en duplicata, $n = 2$.

Tableau 7 : Clivage de *KcapQ*

Caspase	v_0 (U.F./ min/ nM d'enzyme)
3	3,71
7	0,15
8	0,05
10	0,09

Pour KcapQ^{2gen}, l'essai est réalisé en comparant l'efficacité de clivage de la sonde en présence et en absence de caspase 3 recombinante. La figure 15 ci-dessous montre la cinétique obtenue. Comparativement à KcapQ, la cinétique ne montre pas de plateau et l'activité est 66 % plus faible (voir tableau 8). Ceci est dû à la plus faible concentration de caspase 3 recombinante utilisée (12 nM pour KcapQ et 3 nM pour KcapQ^{2gen}) et la plus faible concentration de sonde utilisée (20 nM de KcapQ et 10 nM de KcapQ^{2gen}), ce qui fait que le substrat n'a pas pu être clivé au complet. Il y a cependant un début de plateau vers la fin de la cinétique, ce qui laisse présumer qu'il doit rester peu de substrat non clivé présent dans le milieu réactionnel.

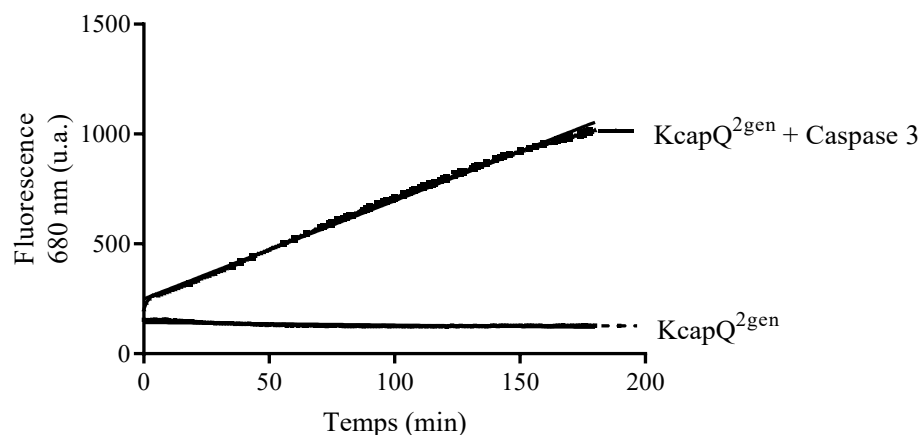


Figure 15 : Activation de KcapQ^{2gen} par la caspase 3

Cinétiques obtenues lors du clivage de KcapQ^{2gen} (10 μ M) en présence et en absence de la caspase 3 recombinante. La sonde a été incubée avec la caspase 3 recombinante (3 nM) pendant 3 h. L'essai a été réalisé en duplicata, n = 1.

Tableau 8 : Clivage de KcapQ^{2gen} par la caspase 3

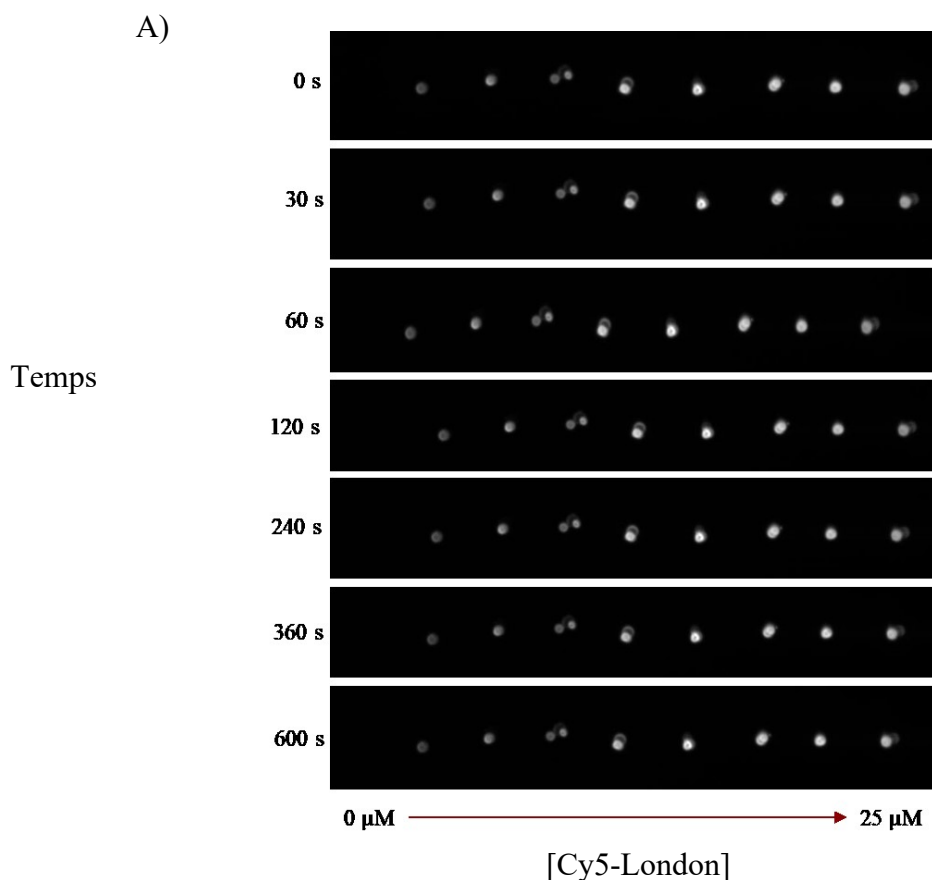
Conditions	v_0 (U.F./ min/ nM d'enzyme)
KCapQ ^{2gen} + Caspase 3	1,49
KCapQ ^{2gen}	-0,04

Cy5-London

Cy5-London n'est pas munie d'un Q et son clivage n'entraîne pas de changement au niveau du signal détecté. Une méthode alternative est nécessaire afin de détecter et de quantifier la sonde clivée. Cette section présente les trois méthodes testées ainsi que les résultats obtenus pour chacune d'elle : 1) CCM, 2) essai à la fluorescamine et 3) UPLC-MS.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est la première technique qui a permis de quantifier la sonde Cy5-London clivée par les différentes caspases. Les milieux réactionnels (enzyme + sonde) sont élués par CCM afin de séparer les molécules de sonde Cy5-London clivées et non clivées. La figure 16 montre les images obtenues par CCM et la quantification. L'intensité des points est quantifiée en intégrant le signal de chaque point à l'aide de l'aire sous la courbe (ASC) obtenue par le logiciel Image-J. La figure 16 B) montre que le signal n'est plus linéaire au-delà de 5 μM , mais les figures 16 C) montrent que le signal est relativement stable dans le temps.



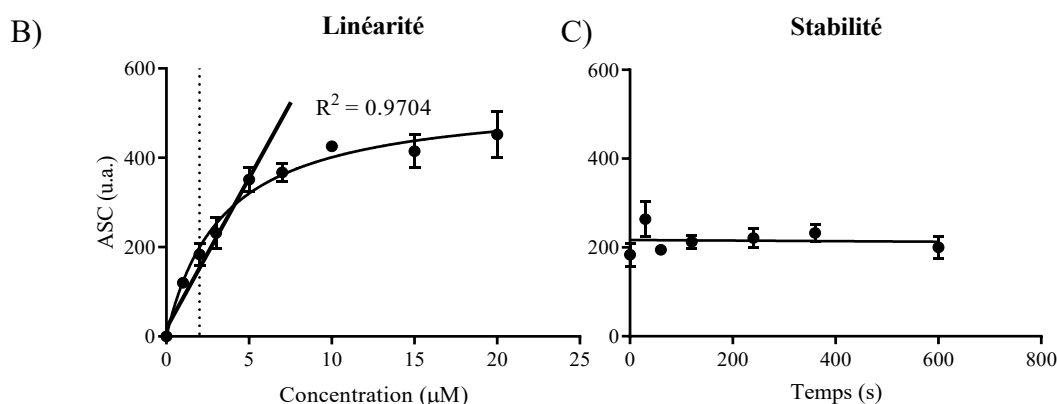


Figure 16 : Caractérisation du signal de Cy5-London sur CCM

A) Exemples d'images obtenues avec l'Optimus. B) et C), quantification du signal selon la concentration et le temps, respectivement. La zone linéaire a été mise en évidence par une régression linéaire avec les données de 0 à 5 μM par le logiciel GraphPad Prism. Le trait vertical en pointillé indique la concentration où Cy5-London est détectée sur CCM. L'expérience a été réalisée en triplicata, n = 1. Les graphiques illustrent la moyenne ± SEM.

Après la caractérisation de l'essai, les échantillons incubés par différentes caspases sont séparés sur CCM (figure 17). Les images obtenues par CCM sont présentées à la figure 17 A) et la quantification relative du signal est présentée à la figure 17 B). L'apparition de l'espèce clivée sur la figure 17 A) est supérieure lorsque Cy5-London est clivée par la caspase 3 comparativement aux caspases 7, 8, 2 et 9. Sur la figure 17 B), les graphiques montrent une absence de plateau et une grande variabilité des mesures, signifiant que la reproductibilité est faible. Ce manque de reproductibilité est étroitement lié à la déposition du milieu réactionnel dans le MeOH 100 % sur la plaque de silice, à l'emplacement exact de la plaque de silice dans l'Optimus, l'appareil à imagerie par fluorescence planaire disponible au CIMS de l'Université de Sherbrooke, et l'excitation non homogène sur la surface de la plaque. Nous avons donc opté pour développer une nouvelle méthode pour détecter Cy5-London clivée, soit l'essai à la fluorescamine.

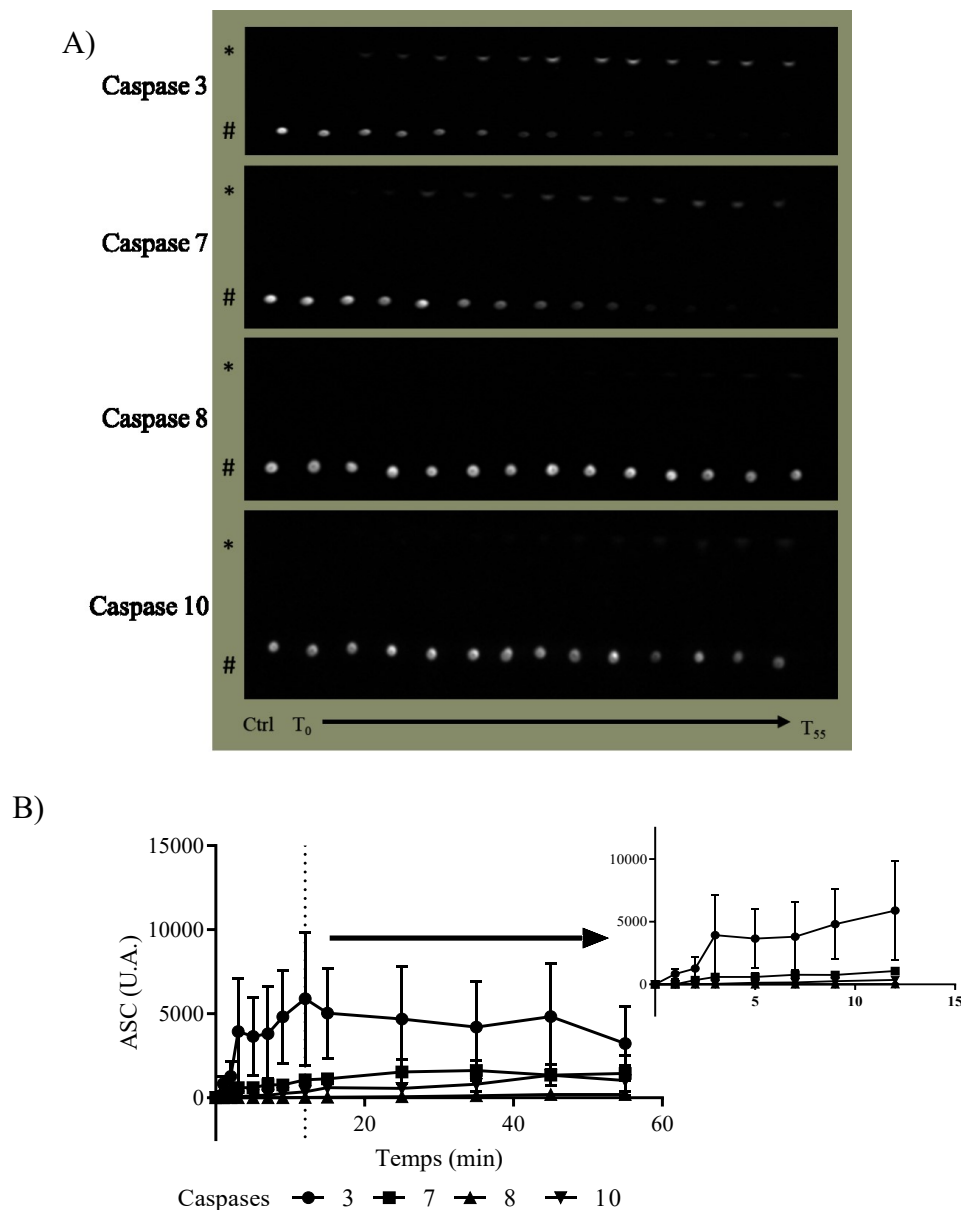


Figure 17 : Détection de Cy5-London clivée par différentes caspases par CCM

La sonde Cy5-London à 25 μM est incubée par les caspases 3, 7, 8 et 10 pendant 55 min. La réaction est stoppée par une dilution 1/5 dans du MeOH 100%, ce qui fait une concentration de sonde finale de 5 μM . **A)** Les points sur les rangées marquées d'un « # » correspondent au produit non clivé et ceux sur la rangée « * » correspondent au produit clivé. Le contrôle (ctrl) correspond à la sonde Cy5-London sans enzyme. Sur toutes les CCMs, on voit l'apparition du produit clivé sur la rangée * et la disparition des points sur la rangée # sur les CCMs où Cy5-London est clivée par les caspases 3 et 7. **B)** la semi-quantification de l'ASC avec Image-J montre un clivage plus important de Cy5-London par caspase 3. La ligne verticale en pointillé délimite la zone mise en évidence à droite. La valeur maximale sur la cinétique obtenue avec caspase 3 est de 5898 u.a. à 12 min. Les valeurs diminuent par la suite de 47 % à 55 min (3129 u.a.). L'expérience a été réalisée en duplicata, $n = 2$.

Essai à la fluorescamine

Ceci est la deuxième méthode investiguée pour détecter et quantifier la sonde Cy5-London clivée. La fluorescamine est une molécule qui forme un complexe fluorescent lorsqu'il se lie avec une amine primaire. Avant de réaliser l'expérience avec nos sondes expérimentales, il faut d'abord caractériser et optimiser l'essai à la fluorescamine. Pour ce faire, une courbe standard avec une molécule simple contenant une amine primaire, le 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol (TRIS), est réalisée. La figure 18 ne montre pas de linéarité à faible concentration de TRIS, une faible reproductibilité de l'essai ainsi que l'absence de plateau. Cela est peut-être dû à une trop faible concentration de TRIS utilisée, ce qui donne une fluorescence trop proche du bruit de fond.

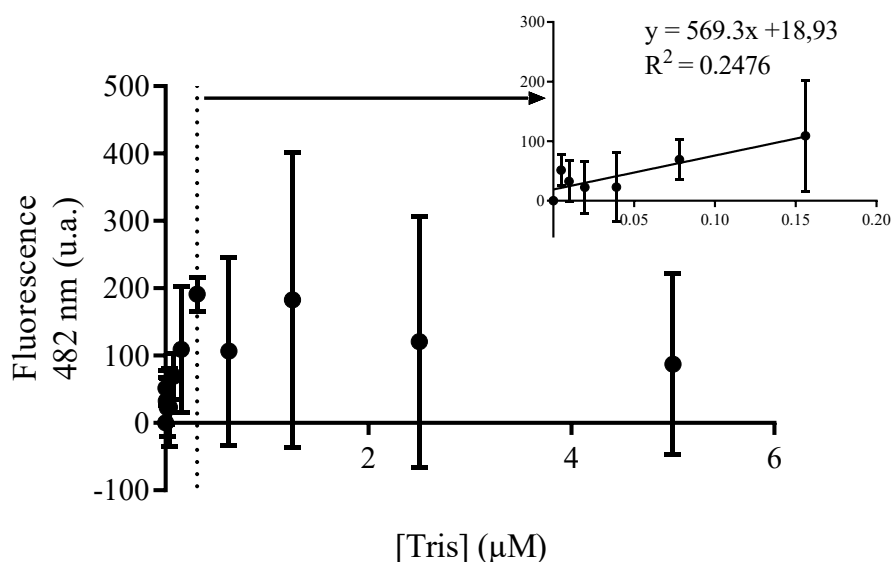


Figure 18 : Caractérisation de la méthodologie de l'essai à la fluorescamine

La fluorescence atteint une valeur maximale à 0,313 μM de TRIS (191 u.a.) qui descend à 87 u.a. à 5 μM de TRIS, ce qui représente une diminution de 54 %. La ligne verticale en pointillé délimite la zone représentée à droite. La linéarité a été testée par régression linéaire sur les points de 0 à 0,150 μM de TRIS. L'expérience a été réalisée en duplicata, $n = 2$.

Malgré les résultats obtenus avec le TRIS, l'essai à la fluorescamine a néanmoins été réalisé avec des échantillons de Cy5-London clivée par la caspase 3. La figure 19 montre une augmentation de la fluorescence dans le temps. L'essai montre une faible variabilité contrairement à l'essai réalisé avec le TRIS. Ces deux observations sont dues à l'utilisation d'une plus grande concentration de sonde (50 μM).

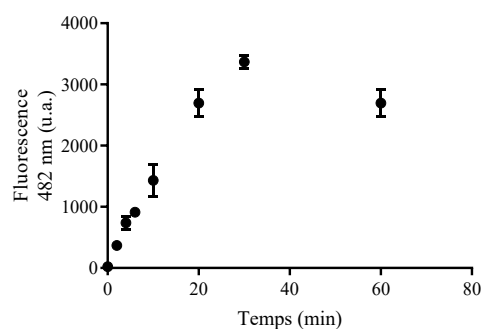


Figure 19 : Essai à la fluorescamine avec Cy5-London clivée par la caspase 3

Le graphique montre que la valeur maximale de fluorescence à 482 nm (3367 u.a.) est atteinte à 30 min d'incubation. L'essai est réalisé en duplicata, n = 2.

Finalement, l'essai à la fluorescamine est réalisé avec Cy5-London clivée par les caspases 3, 7, 8 et 10. La figure 20 montre deux essais réalisés dans les mêmes conditions. Sur la figure 20 A), les fluctuations sont causées par une variation au niveau du pipetage avec la pipette multicanal. Les variations au début de la cinétique sur la figure 20 B) peuvent être causées par la présence de microbulles dans les puits.

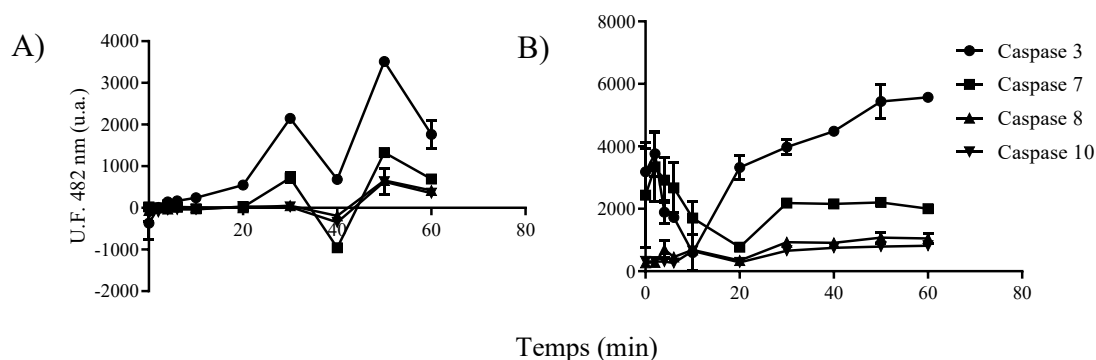


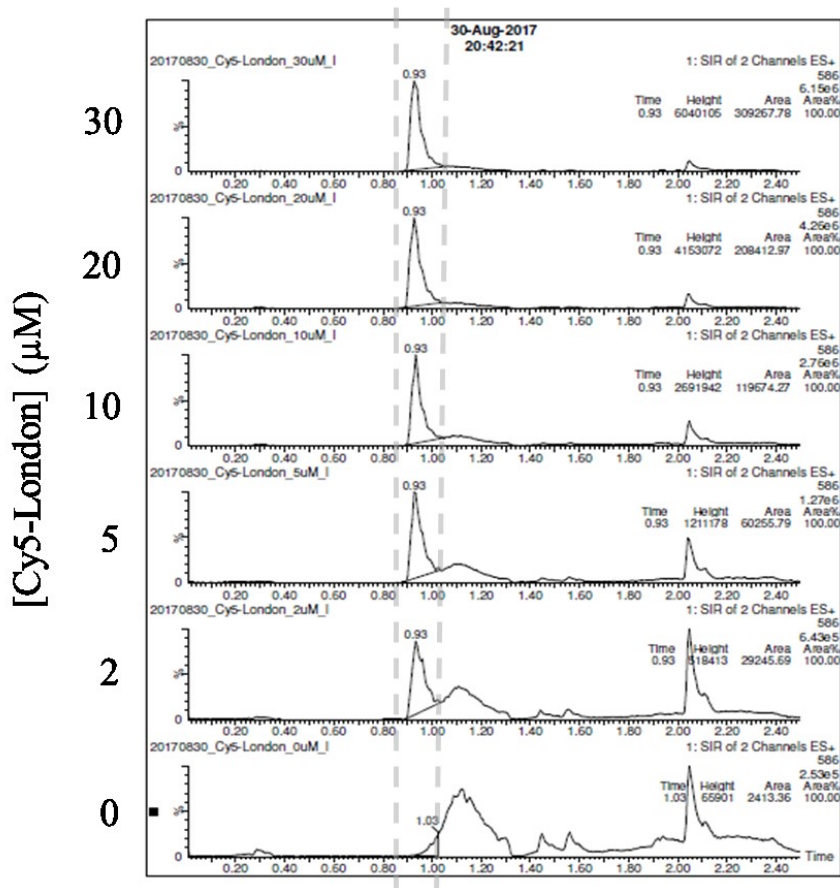
Figure 20 : Essai à la fluorescamine avec Cy5-London clivée par différentes caspases

Les résultats illustrés sur les graphiques A) et B) sont réalisés dans les mêmes conditions, et sont représentés ainsi pour montrer la variabilité entre chaque essai. Chaque essai est réalisé en duplicata.

HPLC-MS

Finalement, la troisième méthode pour quantifier le clivage de Cy5-London consiste à séparer le produit clivé et non clivé par UPLC-MS et de quantifier la quantité de sonde clivée par l'ASC des chromatogrammes. La première étape consiste à caractériser le système, qui se résume à évaluer la linéarité entre le signal et la concentration en nicotinamide (le standard interne, pour corriger les écarts d'ASC entre échantillons causée par des variations de volume d'injection) et la sonde Cy5-London. La figure 21 représente les résultats visant à caractériser l'essai dans le but d'établir les paramètres optimaux. Les chromatogrammes obtenus permettent de mesurer l'ASC des pics, proportionnelle à la quantité de Cy5-London et de nicotinamide. Les figures 21 A) montre les résultats bruts obtenus par le HPLC-MS et en B) la semi-quantification qui montre que la relation linéaire entre la concentration et l'ASC pour les deux produits. Les valeurs d'ASC de la sonde non clivée sont ensuite déterminées.

A)



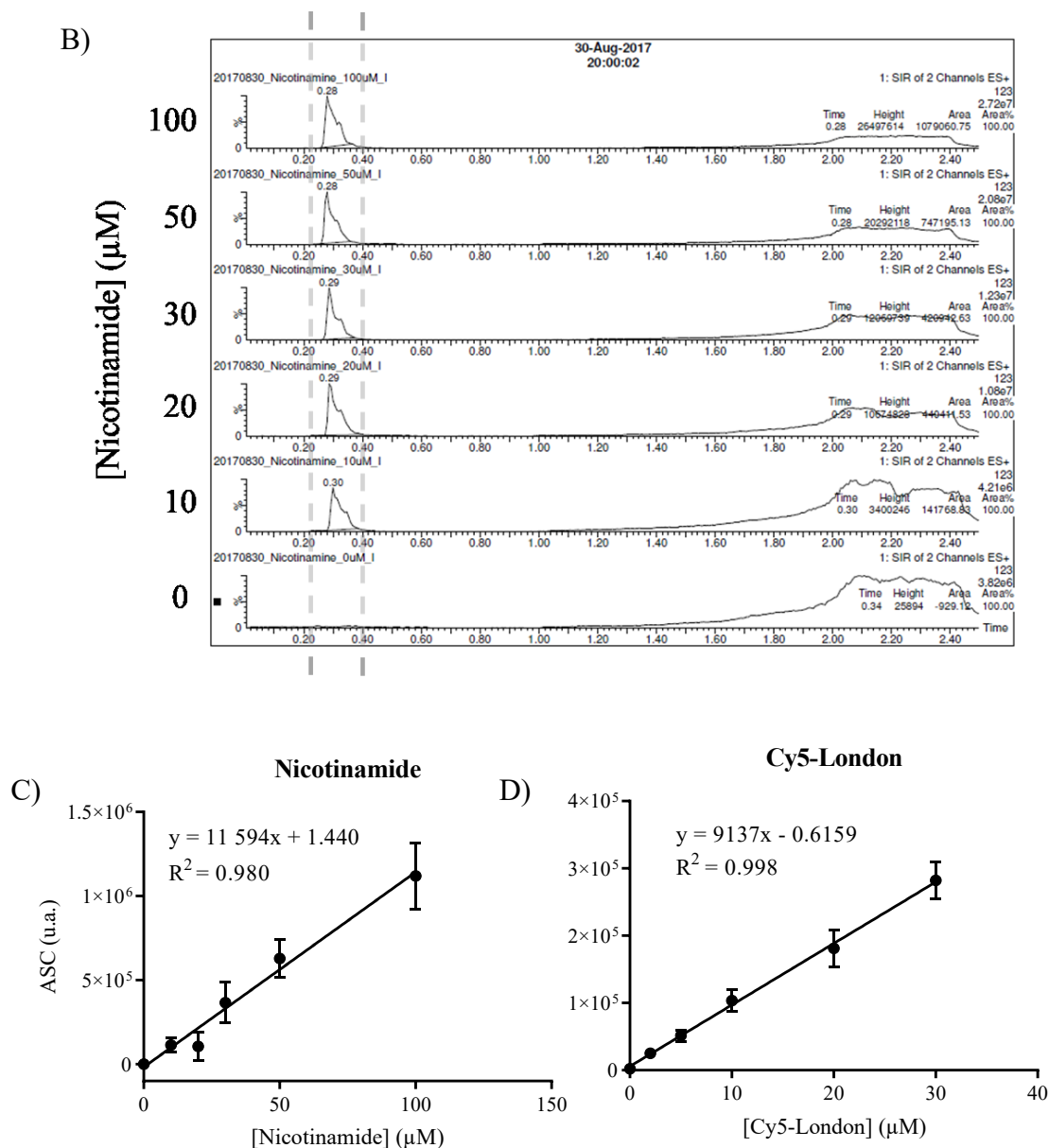


Figure 21 : Test de linéarité des signaux UPLC-MS

Les chromatogrammes A) et B) montrent les pics de sorties (isolés dans les lignes pointillées verticales) de Cy5-London et de la nicotinamide, respectivement. L'ASC de ces pics est calculée automatiquement par l'UPLC-MS. C) et D), représentations graphiques des ASC obtenues par les chromatogrammes. L'expérience a été réalisée en simplicata, $n = 2$.

Par la suite, des échantillons clivés par la caspase 3 sont analysés par UPLC-MS. L'ASC correspondant à Cy5-London non clivée est mesurée puisque toutes les informations nécessaires sont disponibles pour cette espèce grâce à la caractérisation réalisée lors de sa synthèse par la plateforme de synthèse peptidique et de sondes d'imagerie de l'Institut de

Pharmacologie de Sherbrooke. La figure 22 montre qu'il y a une augmentation de la quantité de Cy5-London clivée dans le temps par rapport à la quantité de nicotinamide. L'essai montre une grande variabilité, ce qui signifie que l'essai est peu reproductible. Cela est peut-être causé par les variabilités entre les échantillons dus aux nombreuses étapes de préparations avant l'injection dans l'UPLC-MS (incubation avec les enzymes, arrêt de la réaction et filtration, le transport, etc.). Ces étapes peuvent causer des pertes de substrats ou des dilutions non voulues, ce qui peut au final causer ces variations qui sont significatives compte tenu de la sensibilité de l'UPLC-MS.

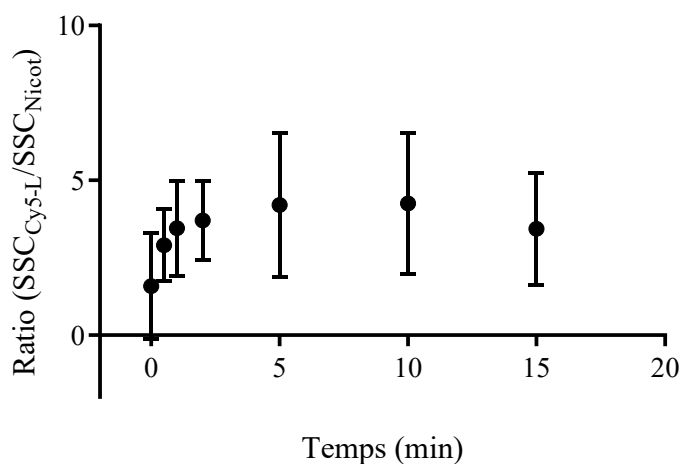


Figure 22 : Détection de Cy5-London par UPLC-MS

La sonde Cy5-London (90 μ M) est incubée avec la caspase 3 (2 nM). Le ratio passe de 1,6 (valeur maximale) à 4,3 u.a. de 0 à 10 min d'incubation. Ce ratio baisse à 3,4 u.a. à 15 min d'incubation. L'essai est réalisé en duplicata, $n = 2$.

L'étape *in vitro* montre que les sondes sont clivées par la caspase 3, bien que les méthodes de détection de Cy5-London ne soient pas reproductibles. La prochaine section montre les résultats *in cellulo* dans les cellules CPNPC en culture.

Étude in cellulo

L'objectif est de déterminer s'il est possible, par le biais des sondes expérimentales Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen}, de distinguer une population de cellules saine d'une population apoptotique. Pour se faire, nous devons d'abord élaborer un modèle cellulaire apoptotique qui présente une activité de la caspase 3.

Afin d'établir un modèle cellulaire dans lequel la caspase 3 est présente et activable, nous avons testé différentes lignées cellulaires et traitements potentiels qui, selon la littérature, devraient nous permettre d'obtenir une activité caspase 3. Pour valider cette activité, nous avons aussi comparé différents marqueurs de l'activité de la caspase 3. L'efficacité de ces marqueurs servira de référence pour comparer l'efficacité des sondes expérimentales et valider leur efficacité.

Validation du modèle apoptotique

Dosage de l'activité caspase 3 à l'Ac-DEVD-pNa

Le modèle apoptotique (lignée A549 traitée à la STS) a d'abord été évalué. L'activité de la caspase 3 est déterminée par essai colorimétrique en mesurant la D.O. à 405 nm à 2 h d'incubation avec un substrat de la caspase 3, l'Ac-DEVD-pNa. Le résultat chez la lignée A549 est comparé à celui obtenu chez la lignée MCF-7 où le gène *CASP3* n'est pas exprimé (ctrl négatif). La figure 23 ne montre pas de différence entre l'activité caspase 3 mesurée chez les cellules A549 et la lignée MCF-7, peu importe la concentration et le temps d'incubation avec la STS.

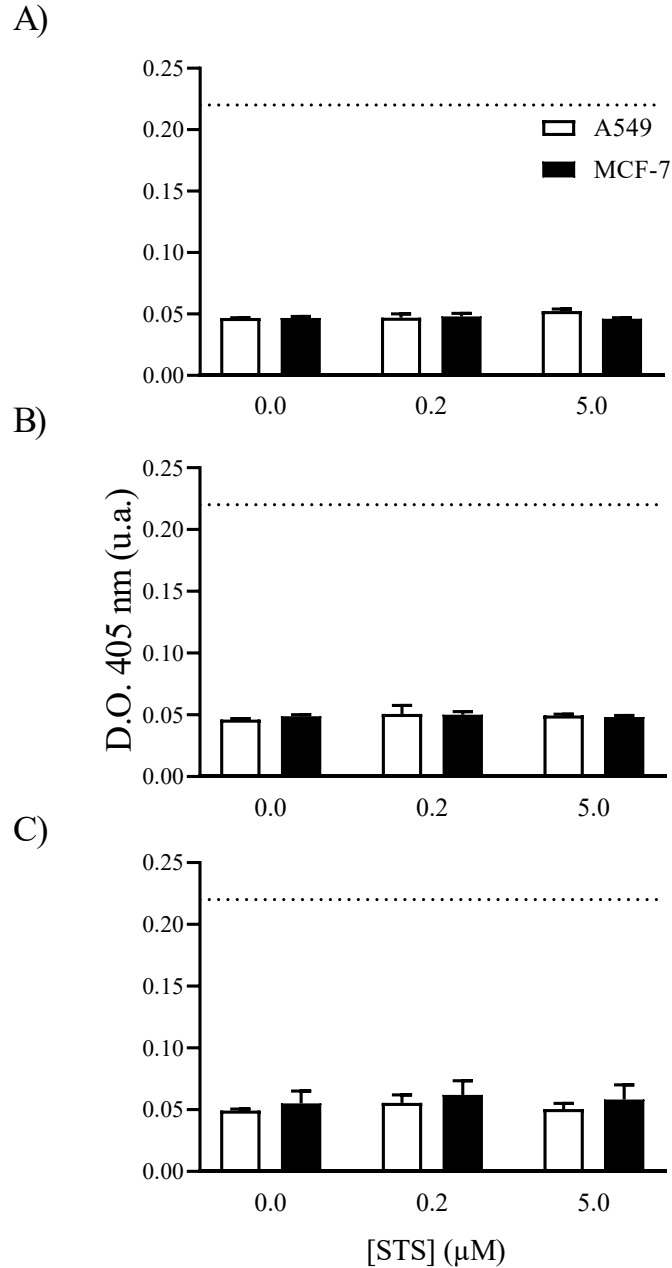


Figure 23 : Activité de la caspase 3 chez les lignées A549 et MCF-7 en fonction de la concentration de STS

Incubation des lignées A549 et MCF-7 (ctrl négatif) pendant 2 (A), 4 (B) et 6 h (C) avec la STS de 0 à 5 μM. La D.O. à 405 nm est mesurée après 2 h d'incubation avec l'Ac-DEVD-pNa (200 μM) dans 100 μg d'extrait de protéine. Le trait pointillé correspond à la D.O. maximale obtenue après le clivage complet de l'Ac-DEVD-pNa par la caspase 3 recombinante (2 nM). Essai réalisé en duplicata, n = 2.

Puisqu'il n'y a pas de différence entre l'activité mesurée chez les cellules A549 et les cellules MCF-7, l'apoptose a été induite chez la lignée A549 par d'autres traitements (5-FU ou aux UV). Les résultats présentés à la figure 24 ne montrent pas de différences au niveau de l'activité caspase 3 mesurée chez les cellules traitées comparativement à leur contrôle respectif non traité.

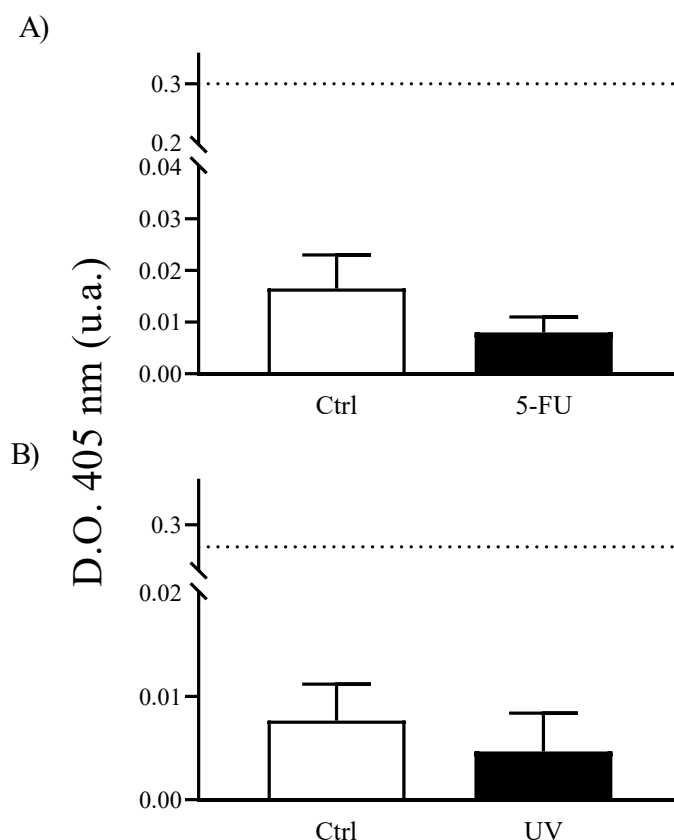


Figure 24 : Activité de la caspase 3 chez les cellules A549 après une exposition au 5-FU ou aux UV

La lignée A549 est traitée au 5-FU 100 μ M 48 h (A) ou aux UV à 100 j/m² puis laissée 48 h (B). La D.O. est mesurée dans 100 μ g de protéine des lysats cellulaires après 2 h d'incubation avec le substrat, l'Ac-DEVD-pNa (200 μ M). La valeur maximale illustrée par les pointillés horizontaux correspond à la quantité de substrat complètement clivé par la caspase 3 recombinante (2 nM). L'essai est réalisé en duplicata (5-FU) et en triplicata (UV), n = 2. Le graphique B) illustre la moyenne \pm SEM.

L'activité de la caspase 3 a été par la suite mesurée par essais colorimétriques chez la lignée A549-GFP choisie pour l'implantation dans les poumons de rats. Nous avons traité les cultures à la STS, aux UV et au 5-FU. Sur la figure 25, il semble y avoir une activité de la caspase 3 plus élevée chez les cellules traitées aux UV. Cependant, la valeur de D.O. demeure bien en dessous de la valeur maximale, représentée par les pointillés horizontaux, ce qui montre qu'il y a néanmoins peu de substrat qui a été clivé.

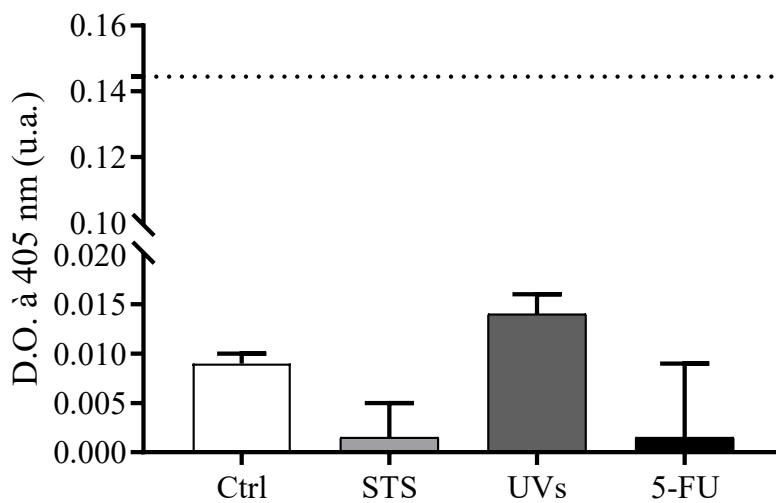


Figure 25 : Activité de la caspase 3 chez la lignée A549-GFP

Les A549-GFP ont été traitées à la STS (1 μ M pendant 4 h), par les UV (100 j/m^2 puis laissées 48 h) ou le 5-FU (100 μ M pendant 48 h). La D.O. est mesurée à 405 nm après 2 h d'incubation avec l'Ac-DEVD-pNa dans 100 μ g de protéine de lysats cellulaires. La valeur maximale illustrée par les pointillés horizontaux correspond à la quantité de substrat complètement clivé par la caspase 3 recombinante (2 nM). L'essai est réalisé en duplicata, $n = 2$.

Étant donné que les résultats ne suggèrent pas la présence d'activité caspase 3 chez les lignées A549-GFP, le test est réalisé avec des cellules HeLa traitées à la STS afin de valider si l'absence d'activité de la caspase 3 n'est pas causée par une mauvaise méthodologie. Au lieu de mesurer la D.O. après 2 h d'incubation avec le substrat colorimétrique, la v_0 de l'Ac-DEVD-pNa (400 μ M) est déterminée en calculant la pente de la zone linéaire de la cinétique par régression linéaire. Cela permet d'éviter les dilutions supplémentaires requises pour avoir une quantité de protéine à 100 μ g et de s'assurer de considérer les D.O. hors du plateau, ce qui potentiellement ne permettrait pas d'observer de différence entre les groupes traités et leur contrôle. La figure 26 montre que l'activité de la

caspase 3 mesurée chez le groupe traité à la STS est supérieure comparativement au contrôle, mais il est impossible de le confirmer si cette différence est significative par le biais d'un test statistique à cause du trop petit échantillon.

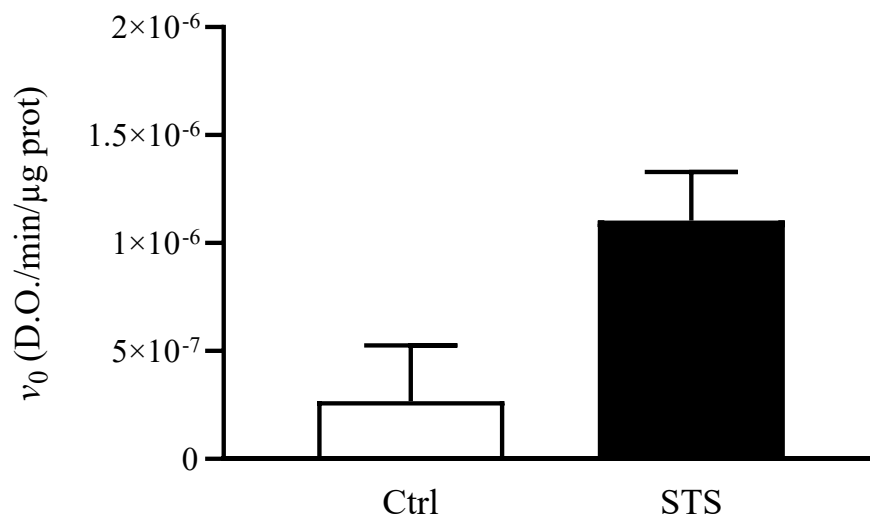


Figure 26 : Activité de la caspase 3 chez la lignée HeLa traitée à la STS

Le groupe traité à la STS ($1 \mu\text{M}$ 4 h) montre une v_0 de $1,10 \times 10^{-6}$ D.O./min/ μ g de protéine ce qui est supérieur à celle du contrôle, qui est de $(2,67 \times 10^{-7}$ D.O./min/ μ g de protéine. Essai réalisé en duplicata, $n = 2$.

Puisqu'il ne semble pas y avoir d'activité détectable dans la lignée A549, celle-ci est remplacée par la lignée H1299 (CPNPC humaine). Comme contrôle négatif, au lieu d'utiliser la lignée MCF-7, les cellules H1299 sont traitées avec un inhibiteur irréversible des caspases, le Z-VAD-(OMe)-FMK afin que le contrôle négatif demeure une lignée de même nature que les autres groupes pour les rendre plus comparables. Le résultat présenté à la figure 27 montre qu'il y a une différence significative entre l'activité caspase 3 observée chez les cellules H1299 traitées à la STS comparativement au contrôle. L'activité n'est pas significativement différente entre le contrôle non traité et le groupe contenant le Z-VAD-(OMe)-FMK (Wilcoxon Mann-Whitney).

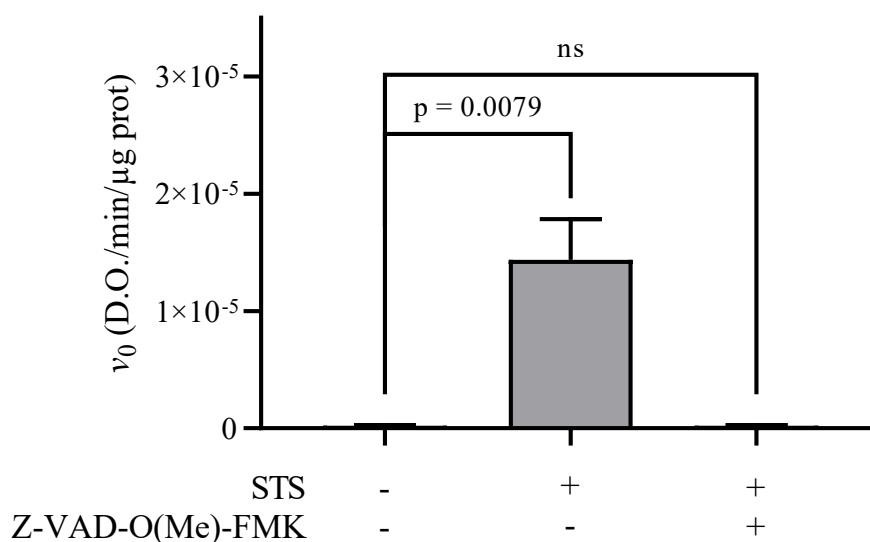


Figure 27 : Activité de la caspase 3 chez les cellules H1299

Un groupe de cellules H1299 ont été traitées à la STS (1 μ M pendant 4 h) et un autre groupe avec le Z-VAD-(OMe)-FMK (50 μ M, 1 h avant la STS). La v_0 est mesurée dans des lysats cellulaires. L'activité chez les cultures de cellules H1299 incubées avec la STS ($1,43 \pm 0,77$) $\times 10^{-5}$ D.O./min/ μ g de protéine est environ 65 fois plus élevée comparativement au contrôle ($2,33 \pm 0,67$) $\times 10^{-7}$ D.O./min/ μ g de protéine et le groupe préincubé avec le Z-VAD-(OMe)-FMK ($2,15 \pm 1,33$) $\times 10^{-7}$ D.O./min/ μ g de protéine. Ce graphique montre la moyenne \pm SEM, $n = 5$.

Ce résultat positif démontre que la méthodologie utilisée ici fonctionne et que l'activité caspase 3 est uniquement détectable dans ce modèle cellulaire. Toutefois, cette méthode ne peut être appliquée qu'à des extraits cellulaires. La quantification de l'activité caspase 3 sera analysée par FACS afin de la mesurer dans des cellules vivantes. Les prochains résultats concernent la détection de l'apoptose par FACS.

Cytométrie en flux (FACS)

Toujours dans l'objectif de valider le modèle apoptotique, l'activité de la caspase 3 a été détectée dans des cellules H1299 vivantes par FACS par le biais des marqueurs apoptotiques fluorogéniques de référence, CellEvent™ et NucView® 488. Ces résultats serviront de référence afin de comparer la capacité de nos sondes expérimentales à détecter l'apoptose chez les cellules H1299 traitées à la STS. La figure 28 montre que l'activité de la caspase 3 chez les cellules H1299 traitées à la STS est déterminée en mesurant la proportion

de cellules positives pour un substrat caspase 3 fluorogénique, le CellEvent™ par FACS. La figure 28 A) montre la proportion de cellules positives pour caspase 3 et la figure 28 B) montre deux exemples de populations telles qu'obtenues en FACS (Ctrl et STS). La proportion de cellules (%) positives pour CellEvent™ tend à être plus élevée chez le groupe traité à la STS comparativement au contrôle.

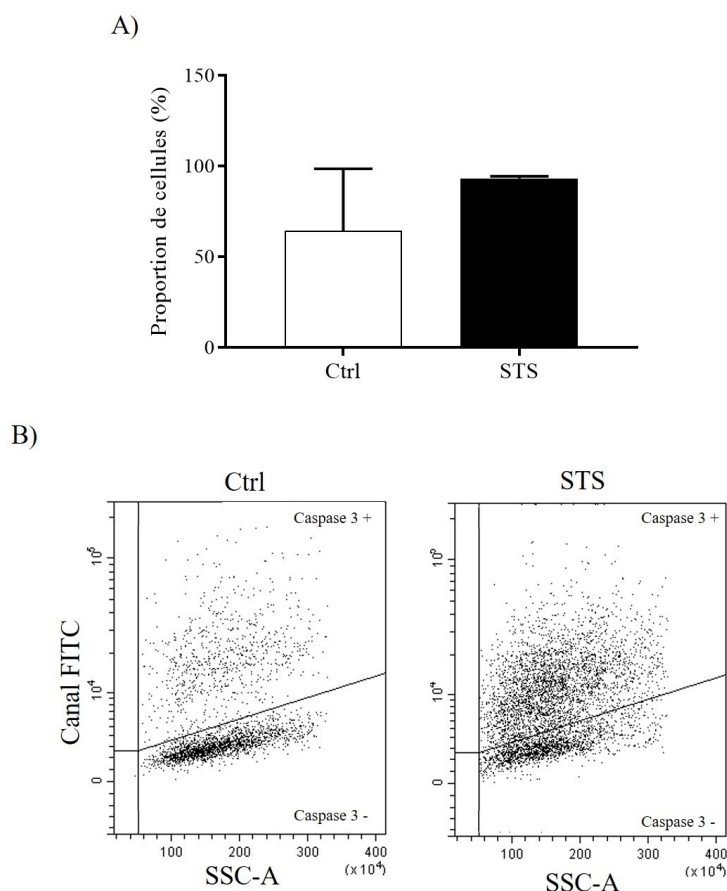


Figure 28 : Détection des cellules H1299 caspase 3 positive par CellEvent™

Les cellules H1299 sont induites en apoptose par la STS 1 μ M pendant 4 h. **A)** La proportion de cellules caspase 3 positive traitées à la STS 93 % qui est de 29 % plus élevée comparativement au contrôle, qui est de 64 %. **B)** On voit un déplacement de la population cellulaire vers des valeurs plus élevées de fluorescence dans le canal FITC qui détecte les cellules caspase 3 positives. Essai réalisé en duplicata, n = 2.

Comme l'essai utilisant CellEvent™ ne donnait pas des résultats se rapprochant de l'essai colorimétrique, un autre substrat fluorogénique de l'activité caspase 3, NucView® 488, a été testée chez la lignée H1299 induite en apoptose par la STS. Après être

clivé par la caspase 3, ce substrat fluorogénique devient fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN. La figure 29 montre la proportion de cellules (%) positives pour l'activité caspase 3 par le NucView® 488. La mort cellulaire est contrôlée avec le marqueur de nécrose, le 7-AAD. La proportion de cellules caspase 3 positives (au-dessus de la ligne noire diagonale en figure 29 B) est supérieure chez les cellules H1299 traitées à la STS. La variabilité des résultats et la proportion de cellules sont inférieures lorsque la caspase 3 est détectée avec NucView® 488 comparativement à CellEvent™ (figure 28), ce qui montre que l'essai est plus reproductible.

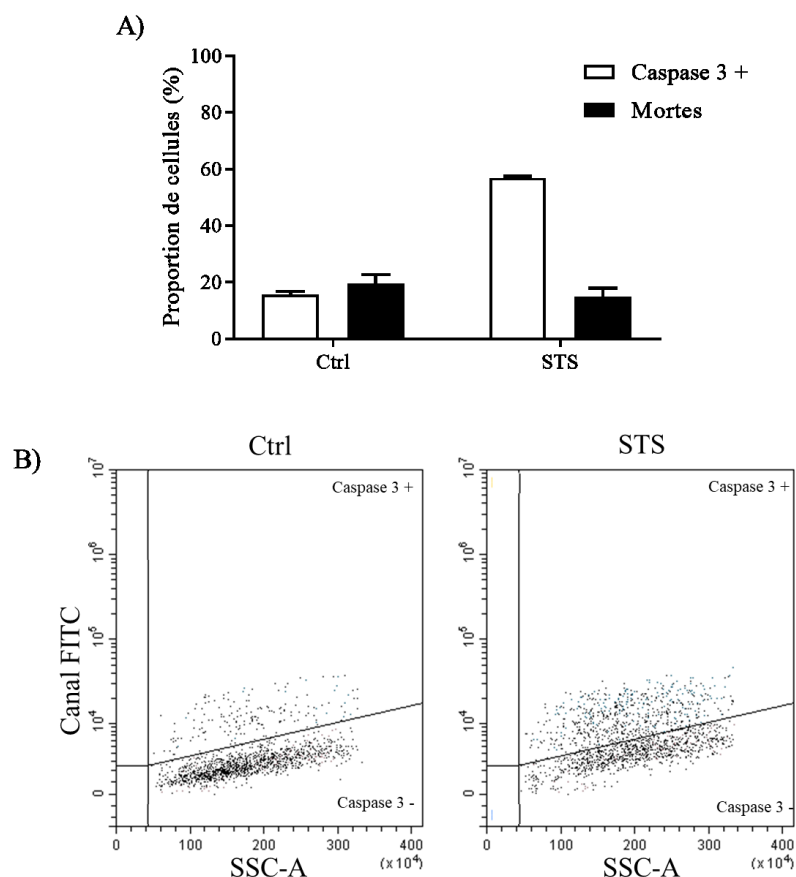


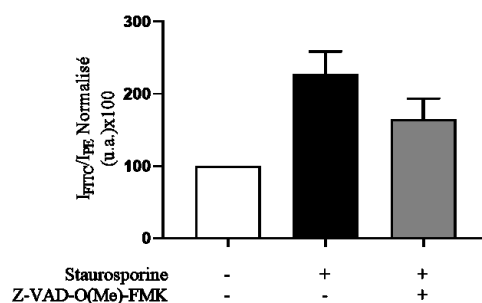
Figure 29 : Détection des cellules H1299 caspase 3 positives par NucView® 488

A) La proportion de cellules caspase 3 positive chez les cellules traitées à la STS (1 μ M pendant 4 h) est plus élevée (57 %) comparativement au contrôle (15 %) ce qui représente une différence de 42 %. La différence au niveau de la proportion de cellules mortes n'est pas significative entre les groupes. **B)** Exemples de résultats obtenus en FACS. Il y a un déplacement vertical de la population de cellules sur le canal FITC qui détecte les cellules caspase 3 positives dans le groupe traité à la STS. L'essai a été réalisé deux fois en duplicata, n = 2.

Le marqueur de perte de $\Delta\Psi_m$, JC-10, a été utilisé pour vérifier la dépolarisation des membranes mitochondriales qui est un événement intracellulaire du processus apoptotique, et ainsi confirmer avec la présence de l'activité de la caspase 3 *via* NucView® 488 l'état apoptotique des cellules. Le ratio d'intensité de fluorescence (I_{FITC}/I_{PE}) a été calculé et normalisé par rapport au contrôle non traité afin de quantifier la perte du $\Delta\Psi_m$. L' I_{PE} détecte JC-10 agrégé dans la mitochondrie lorsque le $\Delta\Psi_m$ est physiologique et l' I_{FITC} détecte la forme monomérique dans le cytosol (prévalent lors de la perte de $\Delta\Psi_m$). Le ratio élevé par rapport au contrôle indique donc que le $\Delta\Psi_m$ est perdu.

Le résultat de l'essai JC-10 présenté à la figure 30 compare la valeur de $\Delta\Psi_m$ du groupe contrôle, un groupe traité à la STS et un autre groupe traité à la STS en combinaison avec le Z-VAD-(OMe)-FMK. La figure 30 A) montre un ratio d'intensité de fluorescence 2,3 fois plus élevé comparativement au contrôle lorsque les cellules H1299 sont traitées à la STS. La présence de l'inhibiteur Z-VAD-(OMe)-FMK diminue le ratio de fluorescence, mais ce dernier demeure 1,6 fois plus élevé comparé au contrôle. La figure 30 B) montre un exemple de populations cellulaires obtenues avec les contrôles positif et négatif. Le déplacement de la population vers des valeurs de fluorescence plus faibles sur le canal PE (qui détecte JC-10 agrégé) témoigne d'une perte de $\Delta\Psi_m$.

A)



B)

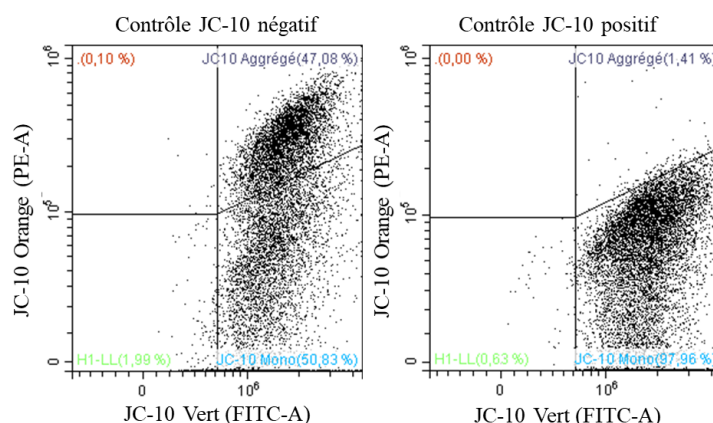


Figure 30 : Potentiel membranaire mitochondrial chez les cellules H1299

A) Le ratio I_{FITC}/I_{PE} est 2,3 fois plus élevé lorsque les cellules sont incubées avec la STS seule (1 μ M pendant 4 h) par rapport au contrôle non traité. Le ratio diminue de 1,6 fois par rapport au contrôle lorsqu'il y a présence de Z-VAD-(OMe)-FMK (10 μ M pendant 1 h avant le traitement à la STS). **B)** Exemples de nuage de points obtenus par FACS. La population de cellules se déplace vers des valeurs d'intensité plus faible sur le canal PE-A au niveau du contrôle positif JC-10 (incubé au CCCP, un agent découpleur de la chaîne mitochondriale, 20 μ M pendant 30 min). Essai réalisé en duplicata, $n = 1$.

Parallèlement au FACS, le substrat CellEvent™ a été évalué par microscopie à épifluorescence. Les premiers essais ont été faits avec les cellules A549, mais puisqu'il n'y avait pas d'activité caspase 3 détectée, cette lignée a été remplacée par les cellules H1299. De plus, le substrat fluorogénique NucView® 488 n'avait pas encore été testé. Les résultats obtenus avec la lignée A549 ont néanmoins été présentés.

Microscopie à épifluorescence

L'objectif est d'élaborer la méthodologie pour valider nos sondes expérimentales par microscopie. La première étape consiste à savoir si nos marqueurs de références commerciaux étaient applicables en microscopie. Les cellules A549 ont été induites en apoptose par la STS et incubées avec du DAPI et la sonde commerciale CellEvent™. La figure 31 montre des images d'une expérience obtenues en microscopie à épifluorescence de cellules A549 en culture dont l'activité caspase 3 est mise en évidence avec CellEvent™. Il n'y a pas de colocalisation entre le DAPI et CellEvent™. Qualitativement, il semble y avoir une plus forte fluorescence dans le vert périnucléaire chez les cellules des cultures traitées à la STS comparativement au contrôle, mais cela demeure à confirmer par une méthode semi-quantitative.

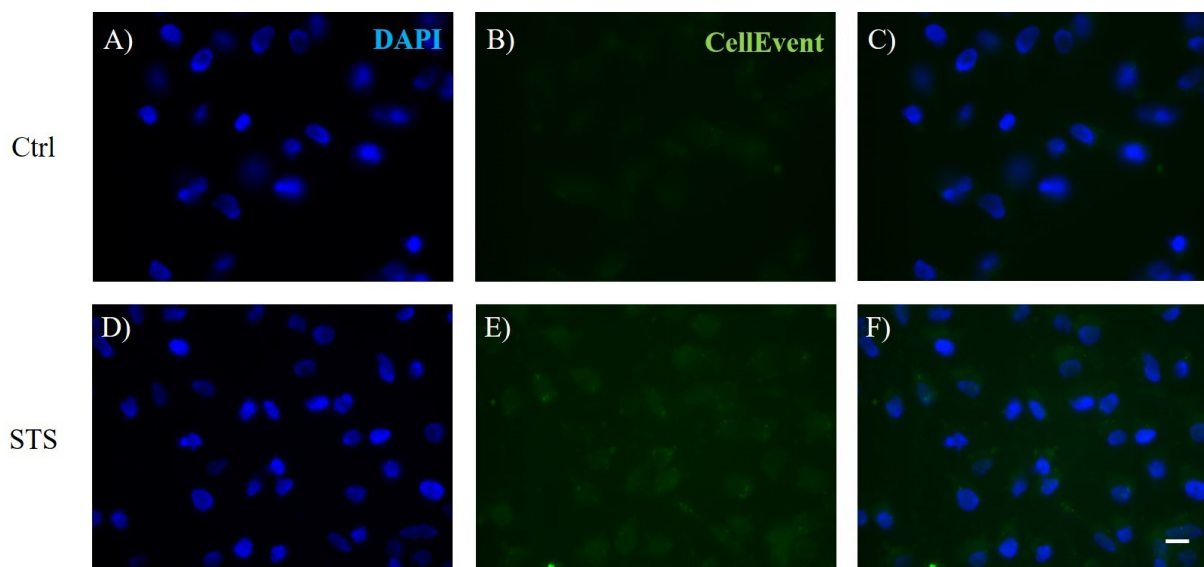


Figure 31 : Détection des cellules A549 apoptotiques par CellEvent™

Les images **A)** à **C)** représentent les lignées contrôle et les images **D)** à **F)** montrent les images obtenues chez les cellules traitées à la STS (1 μ M pendant 4 h). Les colonnes **A-D)**, **B-E)** et **C-F)** représentent les canaux de détection du DAPI, de CellEvent™ et de la fusion des deux, respectivement. L'objectif est à 40x, l'échelle représente 20 μ M.

Puisque les résultats obtenus chez les cellules A549 n'étaient pas concluants, la même méthode a été appliquée, mais en utilisant cette fois-ci la lignée cellulaire H1299. La figure 32 montre des images obtenues en microscopie à épifluorescence de cellules H1299 en culture où l'activité caspase 3 est détectée par CellEvent™. Qualitativement, il semble y

avoir des points de fluorescence plus intenses au niveau périnucléaire chez les cellules H1299 comparativement aux A549. Cette observation doit être quantifiée, car il est possible que ce soit causé par la plus grande densité de cellules sur les images des H1299 comparativement au A549 (voir figure 30). Une semi-quantification sera nécessaire pour apporter une conclusion.

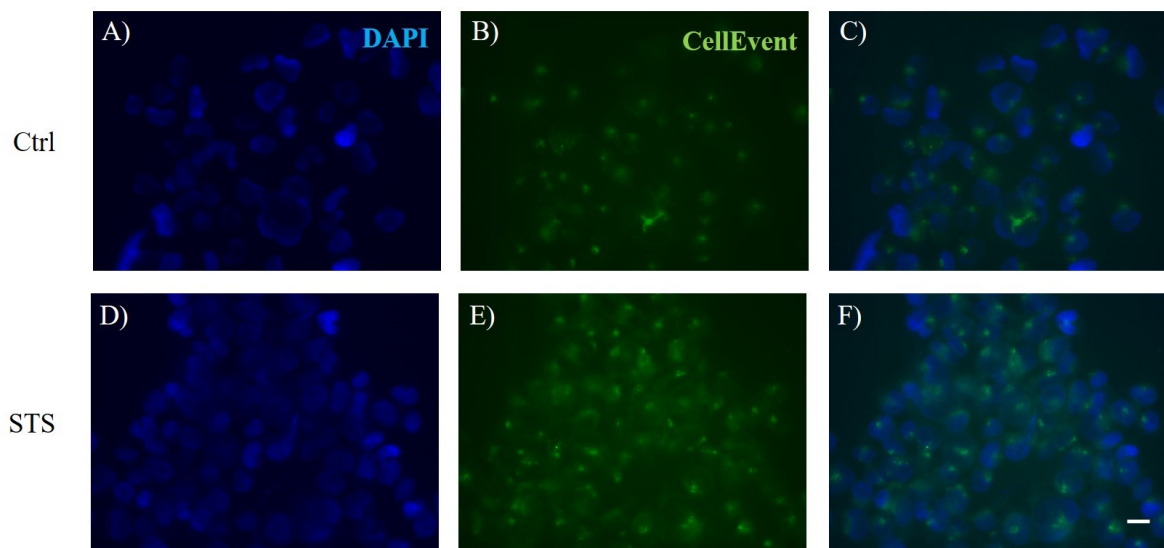


Figure 32 : Détection des cellules H1299 apoptotiques par CellEvent™

Les images **A)** à **C)** correspondent aux cellules saines et les images **D)** à **F)**, aux cellules apoptotiques. Les colonnes **A-D)** correspondent au canal détectant le DAPI, **B-E)** correspondent aux canaux de CellEvent™ puis **C-F)** correspondent à la fusion des canaux du DAPI et de CellEvent™. L'objectif est à 40x, l'échelle représente 20 μ M.

Test des sondes

La lignée cellulaire H1299 traitée à la STS constitue un modèle apoptotique adéquat pour la présence d'une activité de la caspase 3 par colorimétrie et par FACS et de la détection d'une perte de $\Delta\Psi_m$ détectable de façon reproductible. La dernière section *in cellulo* présente la réalisation des tests visant à valider l'efficacité des sondes expérimentales chez ce modèle cellulaire. Les sondes ont été détectées par cytométrie en flux et par microscopie à épifluorescence et confocale.

Cytométrie en flux

La sonde KcapQ a été testée dans le modèle cellulaire apoptotique préalablement établi, c'est-à-dire la lignée H1299 traitée à la STS. Les cellules ont incubé avec la sonde pendant 30 min et 2 h à des concentrations de 1 à 100 nM. La proportion de cellules positives

pour KcapQ a été mesurée par FACS et a été comparée entre nos groupes sains et traités à la STS afin de valider la spécificité de la sonde à l'apoptose.

Sur la figure 33, la proportion de cellules traitées à la STS et positives pour KcapQ est significativement plus faible à une concentration de 100 nM comparativement aux autres concentrations plus faibles. Cette tendance est observée à 30 min et à 2 h d'incubation et suggère un phénomène d'autoatténuation. La proportion de cellules positive pour KcapQ entre le contrôle et les cellules traitées est plus élevée à 30, 10 et 1 nM à 2 h d'incubation. La proportion de cellules H1299 traitées à la STS est similaire à des concentrations de 30 à 1 nM et ce, peu importe si la sonde est incubée 30 min ou 2 h.

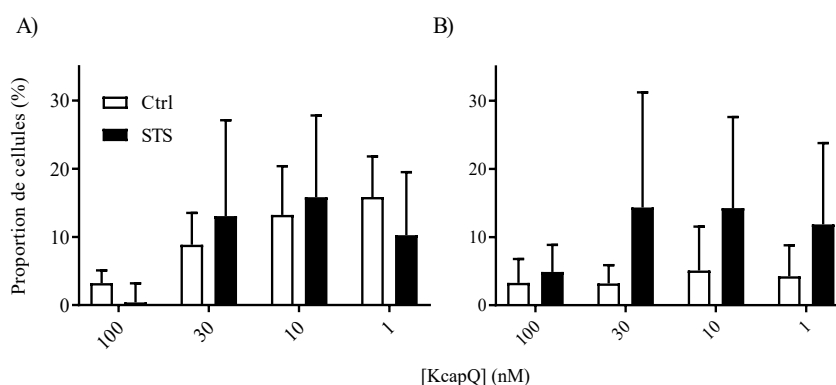


Figure 33 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ par FACS

La sonde KcapQ est incubée à des concentrations de 1 à 100 nM pendant 30 min (A) et 2 h (B) dans une culture de H1299 induite en apoptose (STS 1 μ M pendant 4 h). A) Le nombre de cellules positives pour KcapQ chez les cellules H1299 traitées à la STS passe de 0,38 % (100 nM) à 13,06 % (30 nM). Le % demeure par la suite similaire. B), la proportion de cellules positive passe de 4,89 % à 14,33 %. Essai réalisé en duplicata, n = 2.

La sonde KcapQ^{2gen} est testée par FACS à une concentration de 100 nM. La sonde est incubée avec les cellules H1299 à 0,5 μ M pendant 2 h. Il n'y a pas de différence au niveau de la proportion de cellules positives pour KcapQ^{2gen} entre le groupe contrôle et le groupe traité à la STS. L'absence de différence ne peut pas cependant être appuyée par un test statistique à cause du trop petit échantillon.

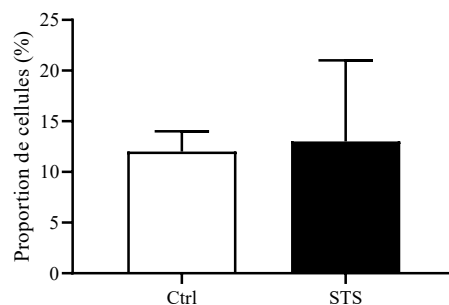


Figure 34 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ^{2gen}

La proportion de cellules (%) positives pour KcapQ^{2gen} (500 nM, 2 h) n'est pas différente entre le groupe Ctrl (12 %) comparativement au groupe traité à la STS 1 μ M pendant 4 h (13 %). Essai réalisé en duplicata, n = 2.

La sonde Cy5-London a été testée exactement de la même façon que KcapQ. La figure 35 montre le test de la sonde réalisé avec Cy5-London chez les cellules H1299 apoptotiques. La proportion de cellules positives pour Cy5-London entre le groupe ctrl et STS n'est pas différente comparé au contrôle, et ce, peu importe le temps d'incubation ou la concentration de sonde utilisée. Le résultat ne peut pas être appuyé par un test statistique à cause du trop petit échantillon.

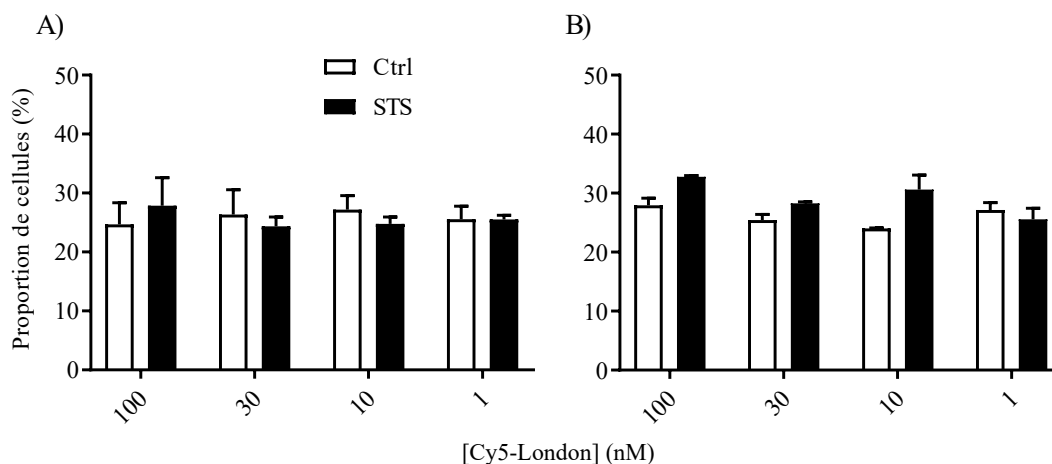


Figure 35 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec Cy5-London

Incubation de la sonde pendant A) 30 min et B) 2 h à des concentrations variant de 1 à 100 nM. Les cellules H1299 sont induites en apoptose par la STS (1 μ M pendant 4 h). Les essais ont été réalisés en duplicata, n = 2.

Microscopie à épifluorescence

Parallèlement au FACS, les sondes KcapQ et Cy5-London sont testées par microscopie par épifluorescence. Sur la figure 36, on constate que les images obtenues avec Cy5-London présentent des agrégats, ou sources ponctuelles, dispersés de façon homogène dans le canal NIR, qui semblent artéfactuels. Le bruit de fond est aussi plus élevé sur avec Cy5-London comparativement à KcapQ. Les images obtenues avec KcapQ montrent un signal dans le NIR localisé au niveau périnucléaire.

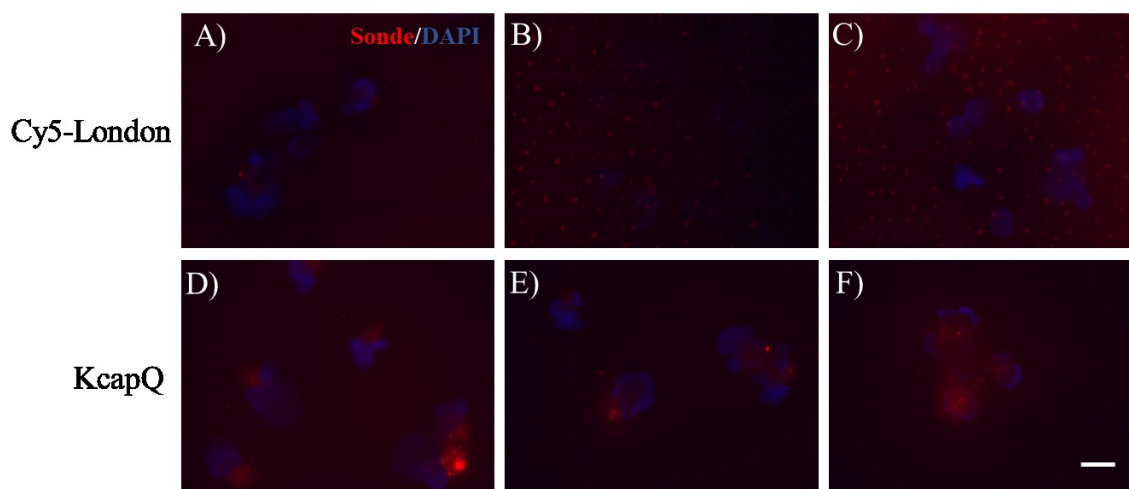


Figure 36 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec Cy5-London

Images obtenues en microscopie par épifluorescence (objectif 40x) avec la lignée H1299 incubée avec les sondes Cy5-London (A-C) et KcapQ (D-F) à 100 nM en conditions non traitées (A et D), traitées à la STS 1 μ M pendant 4 h (B et E) et incubée à la STS avec le Z-VAD-(OMe)-FMK, 10 μ M 1 h avant la STS (C et F). En bleu : canal de détection du DAPI et en rouge : canal de détection des sondes dans le NIR. L'objectif est à 40x, l'échelle représente 20 μ M.

Microscopie confocale

Les cellules H1299 ont été induites en apoptose par la STS et ont été incubées avec KcapQ et placées dans une chambre chauffée du microscope confocal. Des images ont été acquises sur 5 champs de vue pendant 2 h à des intervalles de 2 min afin de suivre son internalisation et son activation dans des cellules apoptotiques. La figure 37 montre les images obtenues à 0, 1 et 2 h d'incubation avec la sonde sur 1 champ de vue. La flèche pointe vers une accumulation de sonde périnucléaire détectable dès l'acquisition de la première image, dont l'intensité augmente dans le temps. Peu de noyaux montrent cette activation.

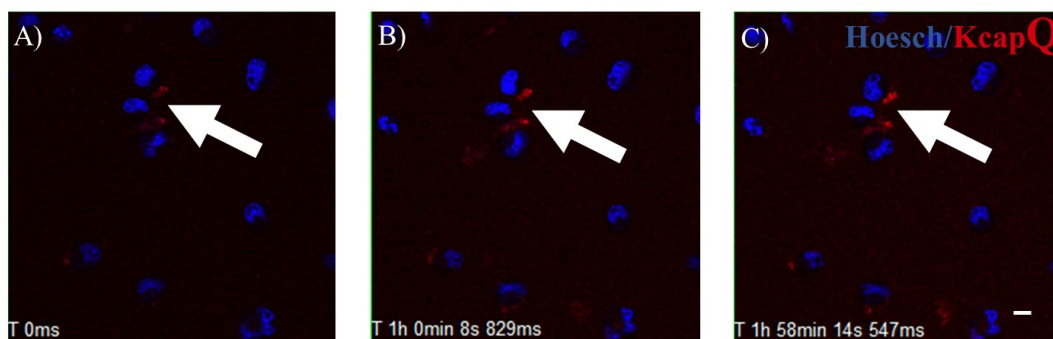


Figure 37 : Détection des cellules H1299 apoptotiques avec KcapQ par microscopie confocale

La sonde KcapQ est incubée à 0,5 μM avec les cellules H1299 traitées à la STS (1 μM pendant 4 h). Les images correspondent à des acquisitions obtenues par microscopie confocale à 0 (A), 1 h (B) et 2 h (C). Le microscope confocal a acquis des photos sur 5 champs de vue pendant 2 h post-incubation avec la sonde à toutes les 2 min. En bleu : canal de détection du Hoechst et en rouge : canal de détection de KcapQ dans le NIR. L'objectif est à 60x, l'échelle représente 10 μM .

Étude *in vivo*

Cette section contient des résultats préliminaires. L'objectif consiste, dans un premier temps, à caractériser nos modèles animaux chez le rat. L'effort a été consacré à établir de la méthode d'inoculation des cellules GFP afin d'optimiser au mieux le succès de l'implantation du modèle CPNPC. De plus, nous avons acquis quelques images par MECF chez le modèle LPS et CPNPC chez des rats où la sonde Cy5-London a été administrée. Dans le cadre de cette maîtrise, nous avons implanté 18 rats, dont 16 rats avec la lignée A549-GFP et 2 avec la lignée H1299-GFP. Deux rats traités au LPS et deux contrôles non traités ont été visualisés par MECF avec la sonde Cy5-London.

Caractérisation du modèle d'implantation orthotopique

Suite à l'inoculation des cellules tumorales, le succès de l'implantation a été visualisé par TDM. L'objectif des images de la figure 38 est de comparer les images de thorax de rat montrant une implantation i.v. seulement qui a échoué (A, C et E) et une implantation transthoracique et i.v. réussie (B, D et F). Les images montrent des zones sombres (de faible densité électronique, correspondant au gaz dans le compartiment alvéolaire) et des zones grises (de forte densité électronique, représentant soit des tumeurs ou des organes). Sur les

figures B), D) et F), les poumons sont obstrués par le fardeau tumoral sur les images de thorax de rats pour lesquels l'implantation a fonctionné.

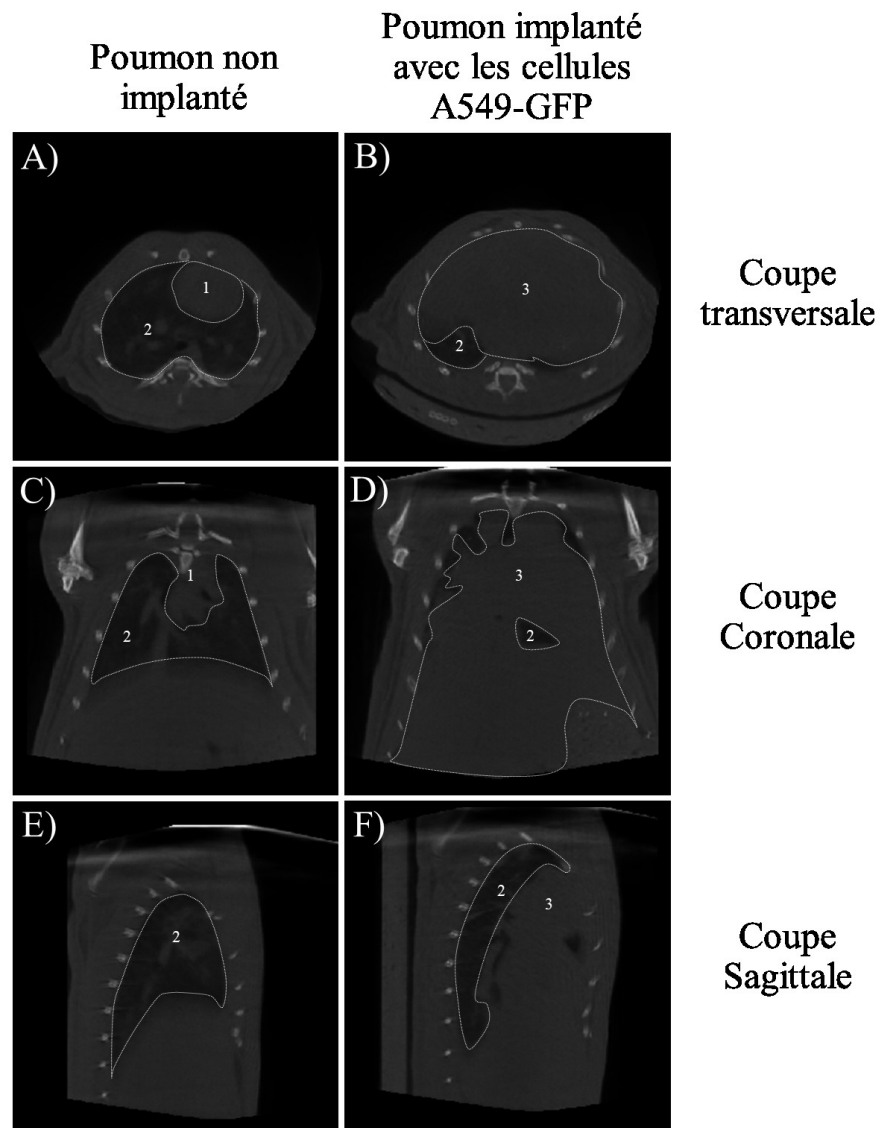


Figure 38 : Comparaison des images TDM d'une implantation réussie et échouée

Thorax de rats acquis par TDM 40 jours post-inoculation (40×10^6 cellules A549-GFP) présentés sur des coupes transversales (A, B), coronale (C, D) et sagittale (E, F). Les images A, C et E, correspondent à un rat implantés i.v. pour lequel aucune implantation n'est détectée. Sur les images B, D et F, l'implantation i.v. et transthoracique est un succès et est validée par observation macroscopique, par histologie et par le CellVizio® (voir figure 39). Les zones délimitées marquées d'un 1 représentent le médiastin, le nombre 2 représente les zones gazeuses de faible densité électronique et le nombre 3 représente des zones de forte densité électronique où il est impossible de distinguer les tumeurs du diaphragme et du médiastin (figures B, D et F).

Le succès de l'implantation est confirmé *ex vivo* et les résultats sont présentés à la figure 39. Sur la figure 39 A), la flèche pointe une masse tumorale grise, d'un aspect différent comparativement aux tissus pulmonaires avoisinants, ce qui est en accord avec l'image 39 B) où la coloration hématoxyline/éosine montre une zone de dysplasie. Sur la figure 39 C), il y a une forte fluorescence dans le vert provenant d'objets de formes rondes correspondant à des amas de cellules A549-GFP implantées.

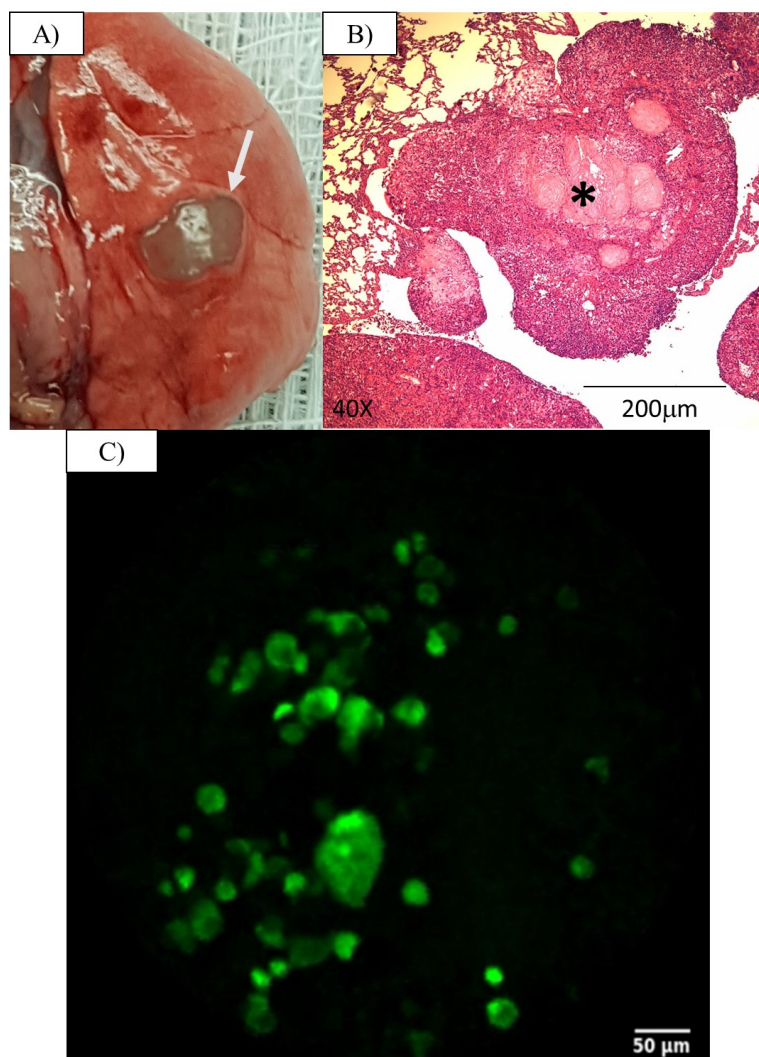


Figure 39 : Confirmation du succès de l'implantation *ex vivo*

A) Une photo macroscopique de poumon de rat qui représente une tumeur implantée par voie transthoracique intercostale. La flèche pointe une masse homogène grisâtre qui se distingue du tissu pulmonaire périphérique. **B)** Une coupe hématoxyline et éosine qui montre une zone d'implantation tumorale (*) correspondant à l'image macroscopique 38 A), mais à l'échelle microscopique. **C)** Une image d'implantations multiples acquise par MECF avec le CellVizio® et la fibre optique S-1500.

MECF in vivo

Les résultats de MECF *in vivo* sont des essais très préliminaires. Les paramètres n'ont pas été contrôlés et optimisés. L'énergie était surtout investie au niveau de la caractérisation du modèle d'implantation orthotopique. Ces modèles requièrent une incubation de 6 semaines post-inoculation, donc afin d'optimiser le temps nous avons opté pour réaliser nos premières acquisitions d'images *in vivo* par le biais de nos sondes expérimentales en même temps que de caractériser nos modèles.

Les premières images sur la figure 40 permettent de voir quelques points de colocalisations entre la sonde Cy5-London et ce qui semble être les cellules A549-GFP chez des rats implantés et traités au cisplatine. Le canal vert (488 nm) détecte l'émission de lumière des cellules A549-GFP, tandis que le canal rouge (660 nm) détecte l'émission de lumière de Cy5-London. Il n'a pas été possible de confirmer la présence des cellules A549-GFP par MECF *in vivo*. La figure 40 B) montre un signal dans le rouge qui semble non-spécifique et sur la figure 40 C), peu de points de colocalisation entre les cellules A549-GFP et la sonde Cy5-London. Ces points sont mis en évidence par les flèches blanches.

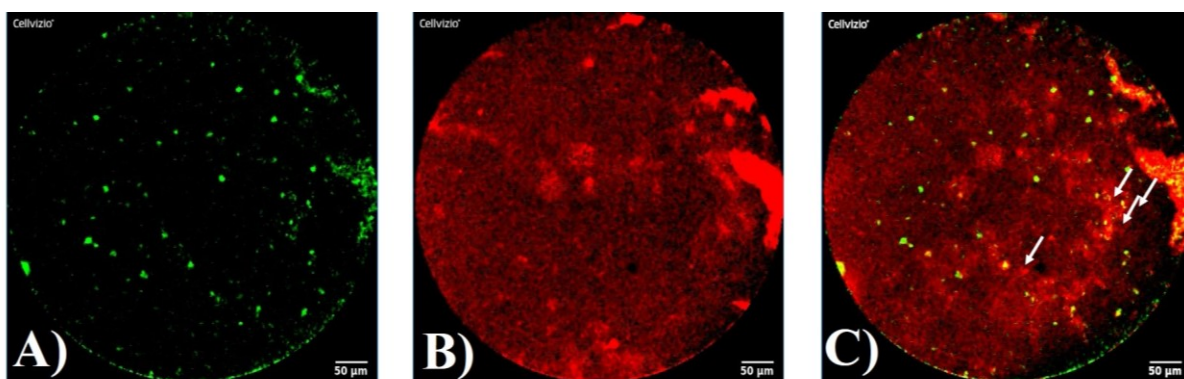


Figure 40 : Colocalisation du signal de Cy5-London et des cellules A549-GFP *in vivo*

L'acquisition est réalisée par MECF avec le CellVizio® avec la fibre optique S-1500 chez des rats nus juvéniles implantés avec les cellules A549-GFP i.v. (4×10^6 cellules, croissance pendant 40 jours) puis traités au cisplatine par mini-pompe osmotique (1,56 mg/ml pendant 2 semaines). A) Le canal 488 (vert) détecte les cellules A549-GFP et l'autofluorescence du tissu conjonctif, B), canal 660 (rouge) qui détecte Cy5-London et C), fusion des deux canaux.

Nous avons par la suite administré la sonde Cy5-London i.v. dans le modèle inflammatoire chez le rat traité LPS (administré intratrachéal) pour suivre l'apparition du

signal de cette sonde dans le temps par MECF. Sur la figure 41, les images acquises chez le même rat par MECF après 20 min (A) et 60 min (B) post-injection de Cy5-London montrent que la fluorescence émise par la sonde Cy5-London dans le canal rouge semble augmenter légèrement dans le temps, mais cette observation doit être confirmée par une quantification du signal. Il est possible de voir de l'autofluorescence dans le vert (488 nm), causée par le tissu conjonctif.

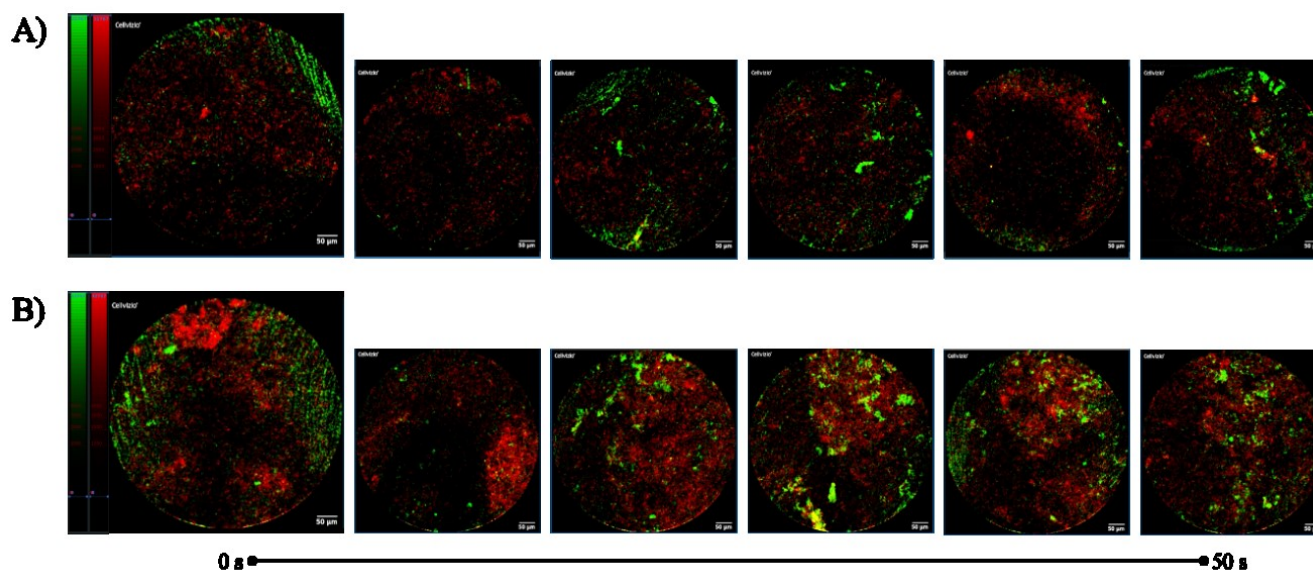


Figure 41 : Internalisation de Cy5-London dans le temps *in vivo* dans le modèle de rat LPS

La série d'images est acquise 20 min (A) et 60 min (B) post-administration de la sonde Cy5-London i.v. réalisée par MECF avec le CellVizio® et la fibre optique S-1500 chez des rats Sprague-Dawley traités au LPS intratrachéal à 3 mg/kg pour 18 h. Il y a 10 s d'intervalle entre chaque image. Le canal 488 (vert) permet de visualiser l'autofluorescence du tissu (collagène, élastine) et le signal du canal 660 (rouge) correspond à la sonde Cy5-London i.v. à une quantité de 4,5 µg.

DISCUSSION

L'objectif de ce projet était de valider des sondes expérimentales qui ciblent l'activité de la caspase 3 afin d'imager l'apoptose pulmonaire par MECEP. En clinique, une telle approche permettrait de suivre en temps réel la progression de physiopathologies de façon non invasive, par exemple, une réponse positive à un agent de chimiothérapie ou la résolution du processus inflammatoire. Ce projet s'est concentré sur les sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen}.

Les sondes expérimentales

Les premières sondes qui ciblent l'activité de la caspase 3 ont été acquises en 2015, un don du groupe de R. Bartha et R. Hudson (Université Western, London, Ontario). Le groupe de Bartha a fourni une version initiale d'une sonde caspase 3 portant un fluorophore «maison» émettant dans l'infrarouge ainsi qu'un chélateur visant à en faire un agent d'imagerie bimodale IRM/optique. Cette sonde possédait aussi un groupement de pénétration cellulaire, ainsi qu'une séquence peptidique sensible à la caspase 3. Une seconde version, portant un fluorophore Cy5, fut aussi fournie comme seconde itération et cette sonde fut appelée Cy5-London. Celle-ci est dépourvue de Q, rendant la fluorescence constitutivement détectable qu'elle soit clivée par la caspase 3 ou non. Toutefois, elle possède un groupement de pénétration cellulaire, qui est retiré par le clivage, emprisonnant théoriquement la sonde dans les cellules où elle a été clivée.

L'idée de départ était de comparer la sonde Cy5-London à une autre sonde activable de la littérature. La première, QCasp3.2 (Debonne et al., 2011 b), n'a jamais pu être synthétisée par notre équipe. La seconde sonde de la littérature, KcapQ, est inspirée de la littérature (Maxwell et al., 2009) et a été synthétisée avec succès. La sonde originale de Maxwell possédait un fluorophore Alexa-Fluor 647. Lors de la synthèse, nous avons opté pour lui donner une cyanine 5 (Cy5). Les deux fluorophores émettent dans le NIR, avec un λ_{ex} près de 650 nm. Les résultats que nous avons obtenus n'étaient pas en accord avec ceux obtenus dans le papier de Maxwell, ce qui nous a amenés à synthétiser de nouveau la sonde KcapQ. Cette fois-ci, la même structure décrite dans l'ouvrage de Maxwell a été conservée ce qui permet d'établir une meilleure comparaison de nos résultats avec les leurs. Dans le cadre de ce projet, cette sonde est nommée KcapQ^{2gen}.

Les études *in vitro*

Pour KcapQ, la sonde est préférentiellement clivée par la caspase 3 et à un plus faible degré, par la caspase 7. Ce résultat est en accord avec ceux retrouvés dans l'article de Maxwell et al. (Maxwell et al., 2009). La valeur de v_0 obtenue lorsque KcapQ est clivée par la caspase 7 est 96 % plus faible que la v_0 obtenue avec la caspase 3. La littérature rapporte qu'il n'y a pas de substrat spécifique à une caspase en particulier, mais plutôt une séquence peptidique particulière dans ce substrat, qui sera préférentiellement reconnue et clivée par une caspase en particulier. Par exemple, une caractérisation de l'activité de la caspase 7 avec des peptides chromogéniques montre que cette enzyme clive la séquence -DEVD- avec une efficacité de 83 % par rapport à la caspase 3 (Talanian et al., 1997). Idéalement, il faudrait déterminer la constante d'efficacité k_{cat}/K_m plutôt que simplement le v_0 . Cette constante prend en considération l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse de clivage, ce qui permet une meilleure comparaison de l'efficacité de clivage entre chaque enzyme pour un substrat donné (Eisenthal et al., 2007).

Les essais *in vitro* préliminaires pour KcapQ^{2gen} consistaient à évaluer si la sonde était stable dans le milieu réactionnel. Bien qu'elle soit clivée par la caspase 3 et stable dans le milieu, il a fallu faire des essais avec les autres caspases pour confirmer que KcapQ^{2gen} est préférentiellement clivée par la caspase 3.

La fluorescence de Cy5-London est détectable même sous sa forme non clivée. Il est nécessaire de développer une autre méthode pour détecter le substrat autre que par sa fluorescence. Les méthodes explorées ont été la CCM, les essais à la fluorescamine et l'HPLC-MS.

CCM

Cette méthode fut initialement optimisée par Mme Catherine Bibeau, qui a réalisé un stage dans le laboratoire du Pr Lesur en 2016. Il avait été établi que dans l'AcONH₄ à pH 8, le peptide de pénétration riche en lysine était chargé positivement et ne migrerait pas dû à sa forte affinité avec la plaque de silice polaire. Il est alors possible de séparer le produit clivé et non clivé. Toutefois, les données obtenues par CCM ne sont pas reproductibles, ceci étant principalement causé par le système d'excitation de la plaque de l'OPTIMUS et du dépôt inégal des échantillons sur la plaque de silice. Le système d'illumination annulaire de l'OPTIMUS ne permet pas d'exciter la plaque uniformément faisant que les échantillons

positionnés vers le centre de la plaque reçoivent davantage de lumière comparativement aux échantillons plus près des extrémités du champ de vue. De plus, le signal obtenu est sensible en fonction de la position de la plaque par rapport à la caméra. Bien qu'il soit possible de régler les coordonnées de la plateforme, il demeure néanmoins difficile de positionner la plaque de silice au même endroit sur la plateforme à chaque expérience. Puisque le signal n'est pas très stable dans le temps, balayer chaque bande successivement n'est pas une option. De plus, le dépôt sur la plaque de silice est de 1 μL ; Ce faible volume augmente les variabilités. Le manque de reproductibilité de cette méthode pour quantifier l'activation des sondes nous a poussés à abandonner cette technique.

Essais à la fluorescamine

La fluorescamine est une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle est complexée à une amine primaire. Cette fluorescence est détectable à 475 nm suite à une excitation à 390 nm (Evans et al., 1984). Selon les résultats obtenus, le bruit rend l'expérience peu reproductible. Les premiers points de la cinétique (où très peu de substrat est clivé) sont importants pour le calcul précis du v_0 . De plus, il y a aussi la présence d'amines primaires ϵ sur la chaîne latérale du peptide de pénétration dû à la présence de lysine. Cela pourrait donner une fluorescence basale élevée qui camoufle le signal de la fluorescamine liée au N-terminal libéré par le clivage de la sonde. Il est cependant mentionné que la fluorescence émise par la liaison de la fluorescamine à un N-terminal est plus intense que sur une amine primaire ϵ (Garesse et al., 1979), mais dans notre système cette différence n'a pas été évaluée. Puisque l'essai à la fluorescamine ne permet pas non plus de quantifier l'activation de la sonde, nous avons opté pour analyser le clivage de Cy5-London par HPLC-MS.

HPLC-MS

Il est possible de constater que la caspase 3 clive Cy5-London par HPLC-MS, mais ces résultats n'étaient pas reproductibles. Ce manque de reproductibilité semble être causé par les manipulations lors de l'essai enzymatique où une différence au niveau de l'efficacité de clivage entre chaque essai. Les tests de linéarité (où il n'y a pas eu clivage par la caspase 3) sur le résultat des figures 20 C) et D) montrent peu de variances, comparativement à la figure 21 où il y a eu clivage de Cy5-London par la caspase 3. La méthode HPLC-MS a été rejetée à la lumière de ces résultats. Il aurait été possible d'optimiser les paramètres, soit la

source d'ionisation, les phases mobile et stationnaire et le débit (Szerkus et al., 2016), mais l'optimisation de cette méthode nécessiterait une trop grande quantité de sondes Cy5- London – considérant le plus faible impact qu'aurait ce résultat *in vitro* sur la preuve de concept. Nous avons donc opté pour investir le temps et les ressources sur les essais cellulaires.

Les études *in cellulo*

Le modèle cellulaire apoptotique

Plusieurs articles de la littérature montrent que les cellules A549, bien que plus résistantes à l'apoptose, possèdent une activité caspase 3 détectable qui peut être quantifiée par le Z-VAD-FMK (Cummings, 2004; Bregoli et al., 2013; Chen et al., 2018). Un traitement à l'activine A (jusqu'à 10 nM) permet d'observer une augmentation de PARP clivé et de caspase 3 clivée (Wang, 2005).

Bien qu'il semble y avoir un consensus sur la résistance des cellules A549 à l'apoptose, les raisons de cette résistance ne sont pas clairement établies. Il a été démontré que la STS à faible dose (0 à 200 nM) pendant plusieurs jours (jusqu'à 21 jours) incubés avec les cellules A549 génèrent des cellules cancéreuses géantes polyploïdes multinuclées, ce qui leur permet d'entrer dans un état de « *pseudosenescence* » réversible (Glassmann et al., 2018). Certains articles mentionnent une résistance acquise par une désensibilisation de la voie de TRAIL. L'apoptose est peut donc être induite *in cellulo* en combinant deux molécules pour palier cette résistance, par exemple la combinaison du ligand TRAIL et la toosendanine, qui induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Li et al., 2017). Étant donné que le projet consistait à développer des sondes pour détecter l'apoptose, nous avons opté pour changer de lignée cellulaire plutôt que d'investiguer davantage la raison de cette résistance. C'est pourquoi les cellules H1299, une autre lignée CPNPC, ont remplacé la lignée A549. Les cellules H1299 ont des mutations qui induisent une expression constitutive du gène *ALK*, une surexpression d'*EGFR* et une sous-expression du gène *p53* (Benchimol, 2001; Nagashima et al., 2009; Friboulet et al., 2014). Ces mutations sont caractéristiques de la majorité des CPNPC et n'empêchent pas, selon nos données, d'obtenir une activité de la caspase 3 par un traitement à la STS (voir figure 26).

Pour l'analyse des FACS, nous avons exclu les cellules mortes pour éliminer l'interaction non spécifique des sondes qui pourraient se retrouver chez les cellules ayant une perte d'intégrité membranaire. Pour détecter la mort cellulaire, nous utilisons initialement l'iodure de propidium qui se lie à l'ADN de façon irréversible lorsque la membrane cellulaire est altérée. Toutefois, retrancher les cellules aux membranes compromises nous empêche de détecter les cellules en fin d'apoptose. Pour cette raison, l'iodure de propidium a été remplacé par le 7-AAD, car celui-ci montre une fluorescence plus stable dans le temps et pénètre les cellules plus lentement, permettant d'exclure un moins grand nombre de cellules (Falzone et al., 2010). Ceci a eu un effet important sur le nombre de cellules considérées. Si l'exclusion des cellules positives pour le 7-AAD n'est pas appliqué aux FACS, il peut y avoir jusqu'à 30 % de plus de cellules positives pour le marqueur de mort cellulaire. Au début, nous utilisons CellEvent™, mais nous obtenions des résultats variables (voir figure 27). Cette variance peut être causée par le fait que le CellEvent™ demeure libre dans le cytosol ce qui, potentiellement, lui permettrait de sortir des cellules dont l'intégrité membranaire est altérée dû à l'induction de l'apoptose et de la mise en suspension pour les FACS. C'est pourquoi nous avons par la suite utilisé NucView® 488 qui se fixe à l'ADN de façon irréversible après être clivé par la caspase 3, ce qui diminue la variabilité (voir figure 28).

Afin de valider l'état apoptotique dans les cellules en culture, nous avons aussi exploré le marquage d'un deuxième événement cellulaire, la perte de $\Delta\Psi_m$ qui est un événement précoce dans le processus apoptotique, par le biais du marqueur JC-10 (voir la figure 27). Lorsque nous incubions avec le Z-VAD-(OMe)-FMK, il était impossible d'obtenir un ratio de fluorescence comparable au contrôle (et donc de renverser la perte de $\Delta\Psi_m$). Ce résultat suggère que la perte de $\Delta\Psi_m$ peut être causé par un mécanisme indépendant des caspases. La littérature reporte que dans une lignée de CPNPC U1810, un traitement à la STS (1 μ M pendant 4 h) précédé d'une préincubation avec le Z-VAD-FMK (50 μ M, 1 h avant la STS) empêche la dégradation du noyau, mais n'empêche pas l'induction du facteur d'induction de l'apoptose qui peut induire la perte de $\Delta\Psi_m$ et la relâche du cyt *c* (Gallego et al., 2004). Puisqu'il n'y a pas de lien direct entre l'activité de la caspase 3 et la perte de $\Delta\Psi_m$, nous avons donc opté pour ne plus utiliser le marqueur JC-10 et de nous concentrer sur la cible, la caspase 3, plutôt que de cibler d'autres événements apoptotiques.

Test des sondes expérimentales

Le FACS a été choisi pour valider l'efficacité de nos sondes, car cela permet, de façon quantifiable, de comparer de façon simultanée la proportion de cellules positives pour les sondes expérimentales et la référence, soit la sonde commerciale NucView® 488. Les sondes expérimentales ont aussi été observées par microscopie (épifluorescence et confocale) comme contrevérification. L'objectif étant toujours de valider l'efficacité de nos sondes avec une sonde commerciale, nous voulions comparer l'efficacité de l'internalisation des sondes avec CellEvent™ par microscopie à épifluorescence. Nous nous attendions à avoir un signal de CellEvent™ plus élevé chez les cellules traitées à la STS comparativement au contrôle non traité, mais ce n'est pas ce qui a été observé. La raison est que le CellEvent™ n'est pas, selon le fournisseur, applicable en microscopie; la raison n'est pas connue. Puisqu'aucun indice ne laissait suggérer que ce marqueur ne fonctionnerait pas en microscopie, nous avons décidé d'évaluer s'il était possible de l'utiliser comme référence. À la lumière des résultats obtenus, l'idée a été rejetée et nous avons décidé de comparer l'activation des sondes expérimentales chez les cellules traitées ou non à la STS et au Z-VAD-(OMe)-FMK, sans marqueur de référence.

Les sondes ne montrent pas de spécificité aux cellules apoptotiques qu'elles soient détectées par microscopie ou par FACS. La sonde Cy5-London ne permet pas de différencier la population de cellules apoptotiques de la population saine, peu importe la concentration de sonde et le temps d'incubation. La sonde KcapQ montre une différence au niveau de la proportion de cellules positives pour la sonde entre les cultures traitées à la STS et le contrôle à des concentrations de 30 nM de sonde et moins, mais cette différence est faible (11,1 %) comparativement à la différence obtenue avec NucView® 488, qui est de 41,3 %. La sonde KcapQ^{2gen}, identique à celle proposée par Maxwell et *al.* et testée dans des conditions très similaires, ne permet pas de différencier la population de cellules apoptotiques des cellules saines (voir figure 34) (Maxwell et al., 2009). Pour les sondes activables, nous avons émis deux théories concernant le manque d'efficacité des sondes.

La première raison expliquant ce manque d'efficacité est la faible solubilité des sondes en milieu aqueux causé par QSY21. Nous avons tenté de dissoudre la sonde lyophilisée KcapQ^{2gen} dans l'eau à une concentration de 1 mM, mais il y a eu formation d'un précipité, alors qu'elle se dissout aussitôt dans le DMSO. Nous avons observé que la sonde colle aux

parois des contenants de plastique et de verre – ce qui pourrait expliquer une partie importante des variations observées dans les essais avec cette molécule. Il n’y a pas de mention particulière dans l’article de Maxwell et al. ou de Barnett et al. d’un problème au niveau de la solubilité des sondes (Barnett et al., 2009; Maxwell et al., 2009). Un autre article où il y a une caractérisation de la sonde Qcasp3.2, dotée de QSY21, mentionne une solubilité relativement bonne dans le tampon caspase exécutrice, dans les milieux de culture ou dans les tampons acides (Jolivel et al., 2014). Un autre laboratoire a ajouté des groupes sulfonate sur QSY21 afin d’augmenter sa solubilité (Verdoes et al., 2013).

La deuxième raison expliquant ce manque d’efficacité est qu’il y avait un phénomène d’autoatténuation qui se produisait lors de nos essais cellulaires, ce qui empêche de détecter un signal. L’autoatténuation est causée lorsque les essais sont entrepris à trop forte concentration avec un temps d’incubation des sondes insuffisant. Lors de l’internalisation des sondes, il peut y avoir une proximité temporaire qui s’estompe avec le temps, annulant l’autoatténuation (Swiecicki et al., 2016). Ce phénomène est observable chez les cellules H1299 incubées avec KcapQ (voir figure 32 B), mais pas avec Cy5-London (figure 35 A et B). Dans la publication de Maxwell, ils ont caractérisé KcapQ^{2gen} par microscopie à épifluorescence chez les cellules HeLa en culture. Non seulement la sonde permet de différencier des cultures apoptotiques et saines, mais aucun phénomène d’autoatténuation n’est rapporté (Maxwell et al., 2009). L’activation de la sonde KcapQ a été visualisée directement de façon longitudinale par microscopie confocale. Les images montrent une faible activation de la sonde, mais aucune perte de signal, ce qui serait le cas s’il y avait de l’autoatténuation. Dans une autre publication, la sonde Qcasp3.2 ne montre pas non plus d’autoatténuation en microscopie chez les cellules HeLa apoptotiques traitées à la STS. Cependant, ce même article mentionne que cette sonde ne fonctionnait pas en FACS et attribue cette observation à l’absence de peptide de pénétration (Debunne et al., 2011).

Les études *in vivo*

Nous voulions valider l’efficacité des sondes *in vivo* dans deux modèles d’atteinte pulmonaire chez le rat par voie endoscopique. En clinique, la voie endoscopique permettrait chez l’humain d’atteindre les voies aériennes distales par les voies naturelles, sans le besoin d’une incision, ce qui rendrait la procédure plus sécuritaire et moins invasive. La voie endoscopique est cependant hasardeuse à cause du petit champ de vue qui cause un manque

de guidance, ce qui ne nous permet pas de nous situer dans le poumon (Ball et al., 2017). Pour pallier à cet inconvénient, l'activité apoptotique dans nos modèles doit être donc ; soit le plus facile possible à trouver, soit contrôlable. Le modèle LPS donne une activité apoptotique généralisée, tandis que le modèle CPNPC donne une activité apoptotique localisée, mais inductible par un agent de chimiothérapie.

Le modèle d'implantation orthotopique CPNPC avec traitement au cisplatine a été choisi pour évaluer l'efficacité de la voie endoscopique à détecter des tumeurs. Puisque le cisplatine induit l'apoptose, la spécificité de la sonde peut être validée en comparant les images acquises par MECP chez les animaux préalablement traités ou non au cisplatine. Le modèle d'inflammation aiguë induite au LPS produit une activité apoptotique massive non spécifique à un type cellulaire ou à un tissu, ce qui permettrait d'évaluer l'efficacité des sondes en comparant l'activation de celles-ci chez l'animal traité et le contrôle non traité. Le laboratoire a déjà confirmé une activité apoptotique par un dosage colorimétrique à l'Ac-DEVD-pNa dans un lysat pulmonaire (voir figure 42 en annexe) dans le modèle CPNPC traité au cisplatine et le modèle inflammatoire.

Élaboration des modèles

Les modèles d'implantation CPNPC sont largement utilisés pour étudier, entre autres, la réponse aux agents de chimiothérapie et les effets de fortes doses de radiations (Szadvari et al., 2016). Pour favoriser le succès de l'implantation, les animaux sont immunocompromis. L'immunosuppression est entreprise par thymectomie, afin d'induire une déficience en lymphocyte T, principal responsable des rejets de transplantations (Ruiz et al., 2013). Lors de nos premières tentatives, les poumons des rats étaient irradiés afin d'induire le processus de réparation pulmonaire et une suppression du système immunitaire inné pour favoriser la réussite (March et al., 2001; Manda et al., 2012). Par la suite, nous avons réalisé avec succès une implantation des cellules A549-GFP par voie transthoracique et i.v. sans irradiation ce qui nous a fait éliminer l'étape d'irradiation. Les animaux homozygotes sont formés par la reproduction sexuée entre des individus consanguins afin de conserver un génotype stable dans un groupe d'individus, ce qui permet de favoriser la reproductibilité des résultats (Osier et al., 2016).

Le succès de l'implantation des cellules A549-GFP est démontré par observation macroscopique, par histologie, par TDM et par MECP *ex vivo* (voir figure 38 et 39).

Seulement 1 rat est décédé 2 semaines avant la date prévue pour l'imagerie par MECF. Le taux de succès lors de l'implantation avec les cellules A549-GFP est de 62 % et aucune implantation n'a fonctionné avec les cellules H1299-GFP. La littérature rapporte des taux de réussite de l'implantation des lignées A549-GFP de 94 % chez la souris et de 60 % chez le rat (Saha et al., 2010; Peng et al., 2014). Les principales raisons de l'échec des implantations sont l'injection des cellules à un mauvais niveau (entre les côtes autres que les côtes 5 et 6) et une incapacité à insérer l'aiguille à une profondeur optimale de façon reproductible (Saha et al., 2010). Il est rapporté dans la littérature que les souris athymiques, bien qu'immunocompromises, peuvent avoir quelques lymphocytes T en périphérie et un système immunitaire inné intact qui peut éliminer les cellules (Shultz et al., 2005). Pour ce qui est de l'échec de l'implantation des lignées H1299-GFP, peut-être que contrairement aux cellules A549-GFP, il serait nécessaire d'irradier les poumons préalablement afin que l'implantation fonctionne. Finalement, il est aussi possible que les cellules H1299-GFP ne soient pas implantables dû à leur plus grande susceptibilité à la mort cellulaire.

L'imagerie par MECF de Cy5-London

Nous avons en main une plus faible quantité de sondes KcapQ comparativement à la sonde Cy5-London. Puisque nous avons opté pour tester la sonde parallèlement à la caractérisation de nos modèles, nous avons administré Cy5-London plutôt que KcapQ.

Dans nos premiers essais, la sonde Cy5-London était instillée directement dans les voies aériennes, mais puisqu'elle est fluorescente dans son état initial, le signal était si élevé qu'il saturait les canaux de détection du CellVizio® au niveau des muqueuses. Cy5-London a donc été testée dans le modèle LPS par injection i.v, ce qui a permis d'éliminer ces signaux. Puisque la sonde est injectée i.v., il est possible qu'elle soit clivée par les protéases plasmatiques. De plus, l'inflammation causée par le LPS induit une augmentation de la perméabilité des capillaires alvéolaires, donc si une augmentation de la fluorescence de la sonde en situation inflammatoire est observée, il faut valider que ce signal n'est pas causé par la perte de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire (Uhlig et al., 2014). Si la caractérisation implique une sonde activable, cela pourrait être fait par l'ajout d'un troisième groupe traité avec l'inhibiteur de caspases Z-VAD-(OMe)-FMK, mais il peut lui-même induire de l'inflammation au niveau pulmonaire (van den Berg et al., 2015). La perméabilité devra donc être contrôlée, par exemple, en utilisant la fluorescéine couplée à un dextran et

co-injectant cette dernière avec la sonde caspase 3. Les deux sondes seraient ensuite détectées par un canal différent du CellVizio®, ce qui permettrait de déterminer quelle proportion du signal de la sonde caspase 3 est due à une augmentation de la perméabilité des capillaires alvéolaires et quelle proportion est due à l'activation et à l'accumulation de la sonde grâce à son peptide TAT. Comme ces contrôles n'ont pas été réalisés puisqu'il s'agissait d'essais très préliminaires, il n'est pas possible de tirer de conclusion à l'aide des images MECF sur la spécificité de la sonde Cy5-London à l'apoptose.

Chez le modèle CPNPC, nous nous attentions à voir des points de colocalisation entre les cellules A549-GFP (canal vert) et la sonde Cy5-London (canal rouge), mais il est difficile de déterminer si, par endoscopie, la fibre optique est en contact avec une muqueuse ou une tumeur. Nous avons visualisé des amas de points vert plus intenses suivant le mouvement respiratoire, ce qui suggère que ces amas sont des tumeurs attachées au tissu. En accord avec ce qui est obtenu *in cellulo*, il n'est pas possible de distinguer clairement une activation de la sonde Cy5-London dans les tumeurs par MECF *in vivo*. Tel que mentionné dans la partie *résultats in cellulo* de cette discussion, peut-être que le résultat est causé par une mauvaise solubilité en milieu aqueux, ou à une instabilité dans le plasma. Dans le plasma de rat, il existe plus de 800 peptidases connues - la susceptibilité des futures générations de sondes à ces enzymes devrait être validée (Aletti et al., 2016; D. Rawling et al., 2017). Afin de valider cette instabilité, il est possible d'incuber les molécules peptidiques avec du plasma de rat dilué à 80 % et d'analyser par HPLC-MS (Konsoula et al., 2008).

Conclusion

Les méthodologies *in vitro* et *in cellulo* sont mises au point. Le modèle *in vivo* de CPNPC demeure encore en développement. À la lumière de nos résultats, les sondes Cy5-London, KcapQ et KcapQ^{2gen} ne sont pas de bons candidats pour l'imagerie de l'apoptose pulmonaire *in vivo*.

L'imagerie par MECF consiste à visualiser les tissus à l'échelle moléculaire, en direct et sans prélèvement. Cette caractéristique a permis d'apporter le concept de « *biopsie virtuelle* », c'est-à-dire qu'il serait possible d'établir le phénotype d'un tissu directement, sans prélèvement. L'imagerie moléculaire en direct par MECF permettrait d'établir un suivi en temps réel, de façon non invasive et efficiente ce qui ouvre la porte à la médecine personnalisée, où chaque stratégie de traitement est réalisée en regard des besoins du patient. Présentement, le CellVizio® ne possède que 2 canaux de détection ce qui limite les possibilités. Avec le temps, si plusieurs preuves de concept sont démontrées, la clinique aura accès à des microendoscopes possédant plusieurs canaux, ce qui permettrait d'injecter un mélange de molécules fluorescentes, chacune ciblant une activité biochimique pertinente au diagnostic. Il reste encore beaucoup de preuves à apporter avant que l'imagerie par MECF ne devienne une nouvelle modalité de diagnostic clinique.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abd-Elrahman, I.; Kosuge, H.; Wisnes Sadan, T.; Ben-Nun, Y.; Meir, K.; Rubinstein, C.; Bogyo, M.; McConnell, M. V.; Blum, G., 2016: Cathepsin Activity-Based Probes and Inhibitor for Preclinical Atherosclerosis Imaging and Macrophage Depletion. *PLoS ONE.*, **11**.
- Akram, A. R.; Chankeshwara, S. V.; Scholefield, E.; Aslam, T.; McDonald, N.; Megia-Fernandez, A.; Marshall, A.; Mills, B.; Avlonitis, N.; Craven, T. H.; Smyth, A. M.; Collie, D. S.; Gray, C.; Hirani, N.; Hill, A. T.; Govan, J. R.; Walsh, T.; Haslett, C.; Bradley, M. et al., 2018: In situ identification of Gram-negative bacteria in human lungs using a topical fluorescent peptide targeting lipid A. *Science Translational Medicine.*, **10**.
- Alberg, A. J.; Brock, M. V.; Ford, J. G.; Samet, J. M.; Spivack, S. D., 2013: Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.*, **143**, 1–29.
- Aletti, F.; Maffioli, E.; Negri, A.; Santamaria, M. H.; De Lano, F. A.; Kistler, E. B.; Schmid-Schönbein, G. W.; Tedeschi, G., 2016: Peptidomic Analysis of Rat Plasma: Proteolysis in Hemorrhagic Shock. *Shock (Augusta, Ga.)*, **45**, 540–554.
- Algubory, K.; Houdebine, L., 2006: In vivo imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. *European Journal of Cell Biology.*, **85**, 837–845.
- Al-Gubory, K. H., 2005: Fibered confocal fluorescence microscopy for imaging apoptotic DNA fragmentation at the single-cell level in vivo. *Experimental Cell Research.*, **310**, 474–481.
- Alvarez-Diaz, S.; Dillon, C. P.; Lalaoui, N.; Tanzer, M. C.; Rodriguez, D. A.; Lin, A.; Lebois, M.; Hakem, R.; Josefsson, E. C.; O'Reilly, L. A.; Silke, J.; Alexander, W. S.; Green, D. R.; Strasser, A., 2016: The Pseudokinase MLKL and the Kinase RIPK3 Have Distinct Roles in Autoimmune Disease Caused by Loss of Death-Receptor-Induced Apoptosis. *Immunity.*, **45**, 513–526.
- Asano, F.; Ishida, T.; Shinagawa, N.; Sukoh, N.; Anzai, M.; Kanazawa, K.; Tsuzuku, A.; Morita, S., 2017: Virtual bronchoscopic navigation without X-ray fluoroscopy to diagnose peripheral pulmonary lesions: a randomized trial. *BMC Pulmonary Medicine.*, **17**, 184–184.
- Atreya, R.; Neumann, H.; Neufert, C.; Waldner, M. J.; Zopf, Y.; Willma, M.; App, C.; Münter, T.; Kessler, H.; Maas, S.; Gebhardt, B.; Heimke-Brinck, R.; Reuter, E.; Dörje, F.; Rau, T. T.; Wang, T. D.; Kiesslich, R.; Vieth, M.; Hannappel, E. et al., 2013: P209 In vivo

molecular imaging using fluorescent anti-TNF antibodies and confocal laser endomicroscopy predicts response to anti-TNF therapy in Crohn's disease patients. *Journal of Crohn's and Colitis.*, **7**, 92–93.

Aublanc, M.; Perinel, S.; Guérin, C., 2017: Acute respiratory distress syndrome mimics: the role of lung biopsy. *Current Opinion in Critical Care.*, **23**, 24–29.

Ball, L.; Vercesi, V.; Costantino, F.; Chandrapatham, K.; Pelosi, P., 2017: Lung imaging: how to get better look inside the lung. *Annals of Translational Medicine.*, **5**, 294–294.

Bar-Klein, G.; Cacheaux, L. P.; Kamintsky, L.; Prager, O.; Weissberg, I.; Schoknecht, K.; Cheng, P.; Kim, S. Y.; Wood, L.; Heinemann, U.; Kaufer, D.; Friedman, A., 2014: Losartan prevents acquired epilepsy via TGF- β signaling suppression. *Annals of Neurology.*, **75**, 864–875.

Barnett, E. M.; Zhang, X.; Maxwell, D.; Chang, Q.; Piwnica-Worms, D., 2009: Single-cell imaging of retinal ganglion cell apoptosis with a cell-penetrating, activatable peptide probe in an in vivo glaucoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **106**, 9391–9396.

Barrow, A.; Pandit, J. J., 2017: Lung ventilation and the physiology of breathing. *Surgery (Oxford).*, Cardiothoracic Surgery - II, **35**, 227–233.

Baselski, V. S.; Wunderink, R. G., 1994: Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clinical Microbiology Reviews.*, **7**, 533–558.

Beaudouin, J.; Liesche, C.; Aschenbrenner, S.; Hörner, M.; Eils, R., 2013: Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation.*, **20**, 599–610.

Bechara, C.; Sagan, S., 2013: Cell-penetrating peptides: 20years later, where do we stand? *FEBS Letters.*, **587**, 1693–1702.

Benchimol, S., 2001: p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell death and differentiation.*, **8**, 1049–1051.

Benias, P. C.; Wells, R. G.; Sackey-Aboagye, B.; Klavan, H.; Reidy, J.; Buonocore, D.; Miranda, M.; Kornacki, S.; Wayne, M.; Carr-Locke, D. L.; Theise, N. D., 2018: Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Scientific Reports.*, **8**, 4947.

Biederer, J.; Beer, M.; Hirsch, W.; Wild, J.; Fabel, M.; Puderbach, M.; Van Beek, E. J. R., 2012: MRI of the lung (2/3). Why ... when ... how? *Insights into Imaging*., **3**, 355–371.

Blodgett, A. B.; Kothinti, R. K.; Kamyshko, I.; Petering, D. H.; Kumar, S.; Tabatabai, N. M., 2011: A Fluorescence Method for Measurement of Glucose Transport in Kidney Cells. *Diabetes Technology & Therapeutics*., **13**, 743–751.

Boatright, K. M.; Renatus, M.; Scott, F. L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I. M.; Ricci, J. E.; Edris, W. A.; Sutherlin, D. P.; Green, D. R.; Salvesen, G. S., 2003: A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*., **11**, 529–541.

Bouchier-Hayes, L., 2010: The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*., **14**, 1212–1224.

Bourg-Heckly, G.; Thiberville, L.; Vever-Bizet, C.; Viellero, B., 2008: In vivo endoscopic autofluorescence microspectro-imaging of bronchi and alveoli. In: SPIE (ed.), *In vivo endoscopic autofluorescence microspectro-imaging of bronchi and alveoli*. San Jose, United States, Vol. 6851p. 04.

Breda, A.; Territo, A.; Guttilla, A.; Sanguedolce, F.; Manfredi, M.; Quaresima, L.; Gaya, J. M.; Algaba, F.; Palou, J.; Villavicencio, H., 2018: Correlation Between Confocal Laser Endomicroscopy (Cellvizio®) and Histological Grading of Upper Tract Urothelial Carcinoma: A Step Forward for a Better Selection of Patients Suitable for Conservative Management. *European Urology Focus*., **4**, 954–959.

Bregoli, L.; Benetti, F.; Venturini, M.; Sabbioni, E., 2013: ECSIN\textquotesingles methodological approach for hazard evaluation of engineered nanomaterials. *Journal of Physics: Conference Series*., **429**, 012017.

Brentnall, M.; Rodriguez-Menocal, L.; De Guevara, R. L.; Cepero, E.; Boise, L. H., 2013: Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*., **14**, 32.

Breurken, M.; Lempens, E. H. M.; Meijer, E. W.; Merks, M., 2011: Semi-synthesis of a protease-activatable collagen targeting probe. *Chemical Communications*., **47**, 7998–8000.

Bullock, K. E.; Maxwell, D.; Kesarwala, A. H.; Gammon, S.; Prior, J. L.; Snow, M.; Stanley, S.; Piwnicka-Worms, D., 2007: Biochemical and *in Vivo* Characterization of a Small, Membrane-Permeant, Caspase-Activatable Far-Red Fluorescent Peptide for Imaging Apoptosis[†]. *Biochemistry*., **46**, 4055–4065.

Burri, P. H., 1985: Morphology and respiratory function of the alveolar unit. *International Archives of Allergy and Applied Immunology.*, **76 Suppl 1**, 2–12.

Castedo, M.; Kroemer, G., 2004: La catastrophe mitotique: un cas particulier d'apoptose. *Journal de la Société de Biologie.*, **198**, 97–103.

Cerrato, C. P.; Lehto, T.; Langel, Ü., 2014: Peptide-based vectors: recent developments. *Biomolecular Concepts.*, **5**, 479–488.

Chagnon, F.; Bourgouin, A.; Lebel, R.; Bonin, M. A.; Marsault, E.; Lepage, M.; Lesur, O., 2015: Smart imaging of acute lung injury: exploration of myeloperoxidase activity using in vivo endoscopic confocal fluorescence microscopy. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **309**, 543–551.

Chaitanya, G. V.; Alexander, J. S.; Babu, P. P., 2010: PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling : CCS.*, **8**, 31.

Chauhan, S. S.; Abu Dayyeh, B. K.; Bhat, Y. M.; Gottlieb, K. T.; Hwang, J. H.; Komanduri, S.; Konda, V.; Lo, S. K.; Manfredi, M. A.; Maple, J. T.; Murad, F. M.; Siddiqui, U. D.; Banerjee, S.; Wallace, M. B., 2014: Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy.*, **80**, 928–938.

Chen, M.; Wang, J., 2002: Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death.*, **7**, 313–319.

Chen, T. W.; Wardill, T. J.; Sun, Y.; Pulver, S. R.; Renninger, S. L.; Baohan, A.; Schreiter, E. R.; Kerr, R. A.; Orger, M. B.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Svoboda, K.; Kim, D. S., 2013: Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.*, **499**, 295–300.

Chen, X.; Wang, K. W.; Chen, Y. Q., 2018: Cisplatin induces apoptosis of A549 cells by downregulating peroxidase V. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences.*, **22**, 7289–7295.

Cheng, L.; Alexander, R. E.; MacLennan, G. T.; Cummings, O. W.; Montironi, R.; Lopez-Beltran, A.; Cramer, H. M.; Davidson, D. D.; Zhang, S., 2012: Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Modern Pathology.*, **25**, 347–369.

Cho, J. H.; Lee, P. Y.; Son, W. C.; Chi, S. W.; Park, B. C.; Kim, J. H.; Park, S. G., 2013: Identification of the novel substrates for caspase-6 in apoptosis using proteomic approaches. *BMB Reports.*, **46**, 588–593.

Ciruela, F., 2008: Fluorescence-based methods in the study of protein–protein interactions in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, Protein technologies / Systems biology, **19**, 338–343.

Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü., 2014: Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS nano*., **8**, 1972–1994.

Cory, S.; Huang, D. C. S.; Adams, J. M., 2003: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*., **22**, 8590–8607.

Cowling, V.; Downward, J., 2002: Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death and Differentiation*., **9**, 1046–1056.

Crapo, J. D.; Barry, B. E.; Gehr, P.; Bachofen, M.; Weibel, E. R., 1982: Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *The American Review of Respiratory Disease*., **126**, 332–337.

Cummings, B. S., 2004: Identification of Caspase-Independent Apoptosis in Epithelial and Cancer Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*., **310**, 126–134.

Cunningham, E. E.; Balu, V., 1979: Cardiac Arrest Following Fluorescein Angiography. *JAMA*., **242**, 2431–2431.

Cushway, T. R.; Lanzetta, M.; Cox, G.; Trickett, R.; Owen, E. R., 1996: Assessment of nerve ultrastructure by fibre-optic confocal microscopy. *Microsurgery*., **17**, 444–448.

D. Rawling, N.; J. Barnett, A., 2017, January 9: MEROPS. *MEROPS The Peptidase Database*. Banque de données, .

de Hoyos, A.; DeCamp, M. M., 2014: Surgery for Small Cell Lung Cancer. *Thoracic Surgery Clinics*., Advanced Lung Cancer: Radical Surgical Therapy, **24**, 399–409.

de Prost, N.; Tucci, M. R.; Vidal Melo, M. F., 2010: Assessment of Lung Inflammation With 18F-FDG PET During Acute Lung Injury. *AJR. American journal of roentgenology*., **195**, 292–300.

Debunne, M.; Portal, C.; Delest, B.; Brakenhielm, E.; Lallemand, F.; Henry, J. P.; Ligeret, H.; Noack, P.; Massonneau, M.; Romieu, A.; Renard, P. Y.; Thuillez, C.; Richard, V., 2011a: *In Vitro* and *Ex Vivo* Evaluation of Smart Infra-Red Fluorescent Caspase-3 Probes for

Molecular Imaging of Cardiovascular Apoptosis. *International Journal of Molecular Imaging.*, **2011**, 1–13.

Debunne, M.; Portal, C.; Delest, B.; Brakenhielm, E.; Lallemand, F.; Henry, J. P.; Ligeret, H.; Noack, P.; Massonneau, M.; Romieu, A.; Renard, P. Y.; Thuillez, C.; Richard, V., 2011b: In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Smart Infra-Red Fluorescent Caspase-3 Probes for Molecular Imaging of Cardiovascular Apoptosis. *International Journal of Molecular Imaging.*, **2011**, 1–13.

Dejours, P., 1982: *Physiologie de la respiration*. Flammarion Médecine-sciences, Paris.
del Ciello, A.; Franchi, P.; Contegiacomo, A.; Cicchetti, G.; Bonomo, L.; Larici, A. R., 2017: Missed lung cancer: when, where, and why? *Diagnostic and Interventional Radiology.*, **23**, 118–126.

Dela Cruz, C. S.; Tanoue, L. T.; Matthay, R. A., 2011: Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in chest medicine.*, **32**.

Denault, J. B.; Eckelman, B. P.; Shin, H.; Pop, C.; Salvesen, G. S., 2007: Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)–mediated inhibition of caspase 9. *Biochemical Journal.*, **405**, 11–19.

Denecker, G.; Ovaere, P.; Vandenabeele, P.; Declercq, W., 2008: Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology.*, **180**, 451–458.

Desroches, A.; Boucher, D.; Denault, J. B., 2016: Caspase Family. *Encyclopedia of Signaling Molecules.*, 1–20.

Detterbeck, F. C., 2018: The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.*, **155**, 356–359.

Díaz-Troya, S.; Pérez-Pérez, M. E.; Florencio, F. J.; Crespo, J. L., 2008: The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy.*, **4**, 851–865.

Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W., 2013: Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.*, **1833**, 3471–3480.

Edgington, L. E.; Berger, A. B.; Blum, G.; Albrow, V. E.; Paulick, M. G.; Lineberry, N.; Bogyo, M., 2009: Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes. *Nature Medicine.*, **15**, 967–973.

Eisenthal, R.; Danson, M. J.; Hough, D. W., 2007: Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator? *Trends in Biotechnology*., **25**, 247–249.

Elmore, S., 2007: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*., **35**, 495–516.

Evans, C. H.; Ridella, J. D., 1984: An evaluation of fluorometric proteinase assays which employ fluorescamine. *Analytical Biochemistry*., **142**, 411–420.

Falzone, N.; Huyser, C.; Franken, D. R., 2010: Comparison between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assessment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome. *Andrologia*., **42**, 20–26.

Flamand, E.; Allard, J. L., 2010: *Chimie générale*. Modulo, Québec.

Foersch, S.; Kiesslich, R.; Waldner, M. J.; Delaney, P.; Galle, P. R.; Neurath, M. F.; Goetz, M., 2010: Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut*., **59**, 1046–1055.

Friboulet, L.; Li, N.; Katayama, R.; Lee, C. C.; Gainor, J. F.; Crystal, A. S.; Michellys, P. Y.; Awad, M. M.; Yanagitani, N.; Kim, S.; Pferdekammer, A. C.; Li, J.; Kasibhatla, S.; Sun, F.; Sun, X.; Hua, S.; McNamara, P.; Mahmood, S.; Lockerman, E. L. et al., 2014: The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer discovery*., **4**, 662–673.

Fuchs, F. S.; Zirlik, S.; Hildner, K.; Schubert, J.; Vieth, M.; Neurath, M. F., 2013: Confocal laser endomicroscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *European Respiratory Journal*., **41**, 1401–1408.

Fugazza, A.; Gaiani, F.; Carra, M. C.; Brunetti, F.; Lévy, M.; Sobhani, I.; Azoulay, D.; Catena, F.; de'Angelis, G. L.; de'Angelis, N., 2016: Confocal Laser Endomicroscopy in Gastrointestinal and Pancreatobiliary Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International*., **2016**.

Furrer, P.; Gurny, R., 2010: Recent advances in confocal microscopy for studying drug delivery to the eye: Concepts and pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*., Imaging Techniques in Drug Development, **74**, 33–40.

Gallego, M. A.; Joseph, B.; Hemström, T. H.; Tamiji, S.; Mortier, L.; Kroemer, G.; Formstecher, P.; Zhivotovsky, B.; Marchetti, P., 2004: Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene*., **23**, 6282.

Gao, L.; Sholl, L.; Nishino, M.; Heng, J.; Janne, P.; Oxnard, G., 2015: Clinical Implications of Variant ALK FISH Rearrangement Patterns - ScienceDirect. *Journal of Thoracic Oncology.*, **11**, 1648–1652.

García-Plazaola, J. I.; Fernández-Marín, B.; Duke, S. O.; Hernández, A.; López-Arbeloa, F.; Becerril, J. M., 2015: Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Science.*, **236**, 136–145.

Garesse, R.; Castell, J. V.; Vallejo, C. G.; Marco, R., 1979: A Fluorescamine-Based Sensitive Method for the Assay of Proteinases, Capable of Detecting the Initial Cleavage Steps of a Protein. *European Journal of Biochemistry.*, **99**, 253–260.

Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A., 2003: ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research.*, **31**, 3784–3788.

Gee, M.; M, M., (n.d.) Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of Inflammation*. DOI: 10.1155/2015/146282, .

Georgiadou, S. P.; Sampsonas, F. L.; Rice, D.; Granger, J. M.; Swisher, S.; Kontoyiannis, D. P., 2013: Open-lung biopsy in patients with undiagnosed lung lesions referred at a tertiary cancer center is safe and reveals noncancerous, noninfectious entities as the most common diagnoses. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology.*, **32**.

Giancoli, D. C., 1993: *Physique générale: Ondes, optique et physique moderne*. De Boeck Supérieur.

Glassmann, A.; Carrillo Garcia, C.; Janzen, V.; Kraus, D.; Veit, N.; Winter, J.; Probstmeier, R., 2018: Staurosporine Induces the Generation of Polyploid Giant Cancer Cells in Non-Small-Cell Lung Carcinoma A549 Cells. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam).*, **2018**, 1–7.

Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K. F., 2010: Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology.*, **221**, 3–12.

Goetz, M.; Ziebart, A.; Foersch, S.; Vieth, M.; Waldner, M. J.; Delaney, P.; Galle, P. R.; Neurath, M. F.; Kiesslich, R., 2010: In Vivo Molecular Imaging of Colorectal Cancer With Confocal Endomicroscopy by Targeting Epidermal Growth Factor Receptor. *Gastroenterology.*, **138**, 435–446.

Goldstraw, P.; Crowley, J.; Chansky, K.; Giroux, D. J.; Groome, P. A.; Rami-Porta, R.; Postmus, P. E.; Rusch, V.; Sobin, L.; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions, 2007: The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.*, **2**, 706–714.

Golstein, P.; Kroemer, G., 2007: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences.*, **32**, 37–43.

Guisier, F.; Bohn, P.; Patout, M.; Piton, N.; Farah, I.; Vera, P.; Thiberville, L.; Salaün, M., 2017: In- and ex-vivo molecular imaging of apoptosis to assess sensitivity of non-small cell lung cancer to EGFR inhibitors using probe-based confocal laser endomicroscopy. *PLoS ONE.*, **12**, 1–12.

Gupta, S., 1996: Apoptosis/Programmed Cell Death. In: Gupta, S. & J. J. Cohen (eds.), *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation VI: Cell Cycle and Programmed Cell Death in the Immune System.*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, Boston, MA, pp. 1–9.

Haringsma, J.; Tytgat, G. N.; Yano, H.; Iishi, H.; Tatsuta, M.; Ogihara, T.; Watanabe, H.; Sato, N.; Marcon, N.; Wilson, B. C.; Cline, R. W., 2001: Autofluorescence endoscopy: feasibility of detection of GI neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology. *Gastrointestinal Endoscopy.*, **53**, 642–650.

Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; Lippman, S. M., 2008: Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.*, **359**, 1367–1380.

Hillman, E. M. C.; Amoozegar, C. B.; Wang, T.; McCaslin, A. F. H.; Bouchard, M. B.; Mansfield, J.; Levenson, R. M., 2011: In vivo optical imaging and dynamic contrast methods for biomedical research. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.*, **369**, 4620–4643.

Hof, M.; Hutterer, R.; Fidler, V. (Eds.), 2005: *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells*. Springer series on fluorescence. Springer, Berlin ; New York.

Hu, Y.; Liu, Y.; Kim, G.; Jun, E. J.; Swamy, K. M. K.; Kim, Y.; Kim, S. J.; Yoon, J., 2015: Pyrene based fluorescent probes for detecting endogenous zinc ions in live cells. *Dyes and Pigments.*, **113**, 372–377.

Huang, C.; Sachse, F. B.; Hitchcock, R. W.; Kaza, A. K., 2016: Sensitivity and Specificity of Cardiac Tissue Discrimination Using Fiber-Optics Confocal Microscopy. (Ai, J., Ed.)*PLOS ONE*., **11**.

Hussell, T.; Bell, T. J., 2014: Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews. Immunology*., **14**, 81–93.

James, M. L.; Gambhir, S. S., 2012: A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiological Reviews*., **92**, 897–965.

Jensen, E. C., 2012: Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*., **295**, 1621–1627.

Jolivel, V.; Arthaud, S.; Botia, B.; Portal, C.; Delest, B.; Clavé, G.; Leprince, J.; Romieu, A.; Renard, P. Y.; Touzani, O.; Ligeret, H.; Noack, P.; Massonneau, M.; Fournier, A.; Vaudry, H.; Vaudry, D., 2014: Biochemical Characterization of a Caspase-3 Far-red Fluorescent Probe for Non-invasive Optical Imaging of Neuronal Apoptosis. *Journal of Molecular Neuroscience*., **54**, 451–462.

Keil, V. C.; Funke, F.; Zeug, A.; Schild, D.; Müller, M., 2011: Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria. *Pflugers Archiv*., **462**, 693–708.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*., **26**, 239–257.

Kihara, T.; Nakamura, C.; Suzuki, M.; Han, S. W.; Fukazawa, K.; Ishihara, K.; Miyake, J., 2009: Development of a method to evaluate caspase-3 activity in a single cell using a nanoneedle and a fluorescent probe. *Biosensors and Bioelectronics*., **25**, 22–27.

Kim, P.; Puoris'haag, M.; Co[^]té, D.; Lin, C. P.; Yun, S. H., 2008: In vivo confocal and multiphoton microendoscopy. *Journal of Biomedical Optics*., **13**, 010501.

Konsoula, R.; Jung, M., 2008: In Vitro Plasma Stability, Permeability and Solubility of Mercaptoacetamide Histone Deacetylase Inhibitors. *International journal of pharmaceuticals*., **361**, 19–25.

Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.; Baehrecke, E.; Blagosklonny, M.; El-Deiry, W.; Golstein, P.; Green, D.; Hengartner, M.; Knight, R.; Kumar, S.; Lipton, S.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M.; Tschopp, J.; Yuan, J. et al., 2009: Classification of cell death. *Cell death and differentiation*., **16**, 3–11.

Kuida, K., 2000: Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **32**, 121–124.

Kumar, S., 2009: Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nature Reviews Cancer.*, **9**, 897–903.

Laemmel, E.; Genet, M.; Le Goualher, G.; Perchant, A.; Le Gargasson, J. F.; Vicaut, E., 2004: Fibered Confocal Fluorescence Microscopy (Cell-viZio™) Facilitates Extended Imaging in the Field of Microcirculation. *Journal of Vascular Research.*, **41**, 400–411.

Lakowicz, J. R., 2006: *Principles of fluorescence spectroscopy* 3rd ed. Springer, New York.
Lang, E.; Lang, F., 2015: Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell & Developmental Biology.*, **39**, 35–42.

Laurent, M.; Johannin, G.; Gilbert, N.; Lucas, L.; Cassio, D.; Petit, P. X.; Fleury, A., 1994: Power and limits of laser scanning confocal microscopy. *Biology of the Cell.*, **80**, 229–240.
Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P. H., 2005: Death receptor signaling. *Journal of Cell Science.*, **118**, 265–267.

Lazzari, C.; Spitaleri, G.; Catania, C.; Barberis, M.; Noberasco, C.; Santarpia, M.; Delmonte, A.; Toffalorio, F.; Conforti, F.; De Pas, T. M., 2014: Targeting ALK in patients with advanced non small cell lung cancer: biology, diagnostic and therapeutic options. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, **89**, 358–365.

Lebel, R., 2012: *Imagerie moléculaire de la MMP-2*. Thèse, .

Leblond, F.; Davis, S. C.; Valdés, P. A.; Pogue, B. W., 2010: Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, **98**, 77–94.

Lecchi, M.; Ottobrini, L.; Martelli, C.; Del Sole, A.; Lucignani, G., 2007: Instrumentation and probes for molecular and cellular imaging. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of...*, **51**, 111–126.

Lee, G. H.; Lee, E. J.; Hah, S. S., 2014: TAMRA- and Cy5-labeled probe for efficient kinetic characterization of caspase-3. *Analytical Biochemistry.*, **446**, 22–24.

Lesur, O.; Berthiaume, Y.; Blaise, G.; Damas, P.; Deland, É.; Guimond, J. G.; Michel, R. P., 1999: Acute Respiratory Distress Syndrome: 30 Years Later? *Canadian respiratory journal.*, **6**, 71–86.

Levy, B. D.; Serhan, C. N., 2014: Resolution of acute inflammation in the lung. *Annual Review of Physiology.*, **76**, 467–492.

Li, X.; You, M.; Liu, Y. jian; Ma, L.; Jin, P. pei; Zhou, R.; Zhang, Z. X.; Hua, B.; Ji, X. jun; Cheng, X. ying; Yin, F.; Chen, Y.; Yin, W., 2017: Reversal of the Apoptotic Resistance of Non-Small-Cell Lung Carcinoma towards TRAIL by Natural Product Toosendanin. *Scientific Reports.*, **7**, 42748.

Licha, K.; Olbrich, C., 2005: Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, Non-Invasive Spectroscopic and Imaging Techniques in Drug Delivery, **57**, 1087–1108.

Lossi, L.; Cocito, C.; Alasia, S.; Merighi, A., 2016: Ex vivo imaging of active caspase 3 by a FRET-based molecular probe demonstrates the cellular dynamics and localization of the protease in cerebellar granule cells and its regulation by the apoptosis-inhibiting protein survivin. *Molecular Neurodegeneration.*, **11**.

Lumb, A. B., 2017: *Nunn's applied respiratory physiology* Eighth edition. Elsevier, Edinburgh ; New York.

Lüthi, A. U.; Martin, S. J., 2007: The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation.*, **14**, 641–650.

Mahmoudian, J.; Hadavi, R.; Jeddi-Tehrani, M.; Mahmoudi, A. R.; Bayat, A. A.; Shaban, E.; Vafakhah, M.; Darzi, M.; Tarahomi, M.; Ghods, R., 2011: Comparison of the Photobleaching and Photostability Traits of Alexa Fluor 568- and Fluorescein Isothiocyanate- conjugated Antibody. *Cell Journal (Yakhteh).*, **13**, 169–172.

Maluch, I.; Czarna, J.; Drag, M., 2019: The application of unnatural amino acids in protease probes. *Chemistry – An Asian Journal.*, **0**, 13.

Man, S. M.; Kanneganti, T. D., 2015: Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.*, **16**, 7–21.

Mancini, M.; Machamer, C. E.; Roy, S.; Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A.; Casciola-Rosen, L. A.; Rosen, A., 2000: Caspase-2 Is Localized at the Golgi Complex and Cleaves Golgin-160 during Apoptosis. *The Journal of Cell Biology.*, **149**, 603.

Manda, K.; Glasow, A.; Paape, D.; Hildebrandt, G., 2012: Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. *Frontiers in Oncology.*, **2**.

Mandelkow, R.; Gümbel, D.; Ahrend, H.; Kaul, A.; Zimmermann, U.; Burchardt, M.; Stope, M. B., 2017: Detection and Quantification of Nuclear Morphology Changes in Apoptotic Cells by Fluorescence Microscopy and Subsequent Analysis of Visualized Fluorescent Signals. *Anticancer Research.*, **37**, 2239–2244.

Mao, S. Y.; Mullins, J. M., 2010: Conjugation of fluorochromes to antibodies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **588**, 43–48.

March, T. H.; Marron-Terada, P. G.; Belinsky, S. A., 2001: Refinement of an Orthotopic Lung Cancer Model in the Nude Rat. *Veterinary Pathology.*, **38**, 483–490.

Marieb, E. N.; Hoehn, K., 2010: *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du Renouveau pédagogique, Saint-Laurent, Québec.

Martinez, N. J.; Titus, S. A.; Wagner, A. K.; Simeonov, A., 2015: High throughput fluorescence imaging approaches for drug discovery using in vitro and in vivo three-dimensional models. *Expert opinion on drug discovery.*, **10**, 1347–1361.

Masters, G. A.; Temin, S.; Azzoli, C. G.; Giaccone, G.; Baker, S.; Brahmer, J. R.; Ellis, P. M.; Gajra, A.; Rackear, N.; Schiller, J. H.; Smith, T. J.; Strawn, J. R.; Trent, D.; Johnson, D. H., 2015: Systemic Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology.*, **33**, 3488–3515.

Mathur, A.; Hong, Y.; Kemp, B. K.; Barrientos, A. A.; Erusalimsky, J. D., 2000: Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.*, 10.1016/S0008-6363(00)00002-X, **46**, 126–138.

Matthay, M. A.; Ware, L. B.; Zimmerman, G. A., 2012: The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Clinical Investigation.*, **122**, 2731–2740.

Maxwell, D.; Chang, Q.; Zhang, X.; Barnett, E. M.; Piwnica-Worms, D., 2009: An Improved Cell-Penetrating, Caspase-Activatable, Near-Infrared Fluorescent Peptide for Apoptosis Imaging. *Bioconjugate Chemistry.*, **20**, 702–709.

McCann, T. E.; Kosaka, N.; Turkbey, B.; Mitsunaga, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., 2011: Molecular imaging of tumor invasion and metastases: the role of MRI. *NMR in biomedicine.*, **24**, 561–568.

Miller, F. J.; Mercer, R. R.; Crapo, J. D., 1993: Lower Respiratory Tract Structure of Laboratory Animals and Humans: Dosimetry Implications. *Aerosol Science and Technology.*, **18**, 257–271.

Miscione, G. P.; Calvaresi, M.; Bottoni, A., 2010: Computational Evidence for the Catalytic Mechanism of Caspase-7. A DFT Investigation. *The Journal of Physical Chemistry B.*, **114**, 4637–4645.

Mižíková, I.; Ruiz-Camp, J.; Steenbock, H.; Madurga, A.; Vadász, I.; Herold, S.; Mayer, K.; Seeger, W.; Brinckmann, J.; Morty, R. E., 2015: Collagen and elastin cross-linking is altered during aberrant late lung development associated with hyperoxia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **308**, L1145–L1158.

Mizukami, S.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Urano, Y.; Mashima, T.; Tsuruo, T.; Nagano, T., 1999: Imaging of caspase-3 activation in HeLa cells stimulated with etoposide using a novel fluorescent probe. *FEBS Letters.*, **453**, 356–360.

Molavipordanjani, S.; Tolmachev, V.; Hosseinimehr, S. J., 2018: Basic and practical concepts of radiopharmaceutical purification methods. *Drug Discovery Today.*, **24**, 315–324.
Mordon, S.; Maunoury, V.; Bulois, P.; Desreumaux, P.; Colombel, J. F., 2005: L'endoscopie confocale. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.*, **29**, 314–318.

Moreira, A. L.; Thornton, R. H., 2012: Personalized medicine for non-small-cell lung cancer: implications of recent advances in tissue acquisition for molecular and histologic testing. *Clinical Lung Cancer.*, **13**, 334–339.

Murray, J. F., 1986: *The normal lung: the basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease* 2nd ed. Saunders, Philadelphia.

Nagashima, T.; Ushikoshi-Nakayama, R.; Suenaga, A.; Ide, K.; Yumoto, N.; Naruo, Y.; Takahashi, K.; Saeki, Y.; Taiji, M.; Tanaka, H.; Tsai, S. F.; Hatakeyama, M., 2009: Mutation of epidermal growth factor receptor is associated with MIG6 expression. *FEBS Journal.*, **276**, 5239–5251.

Nature Milestones, 2019: Nature Milestones Timeline, Light Microscopy.

Newton, R. C.; Kemp, S. V.; Yang, G. Z.; Elson, D. S.; Darzi, A.; Shah, P. L., 2012: Imaging parenchymal lung diseases with confocal endomicroscopy. *Respiratory Medicine.*, **106**, 127–137.

Nikolaus, S.; Bauditz, J.; Gionchetti, P.; Witt, C.; Lochs, H.; Schreiber, S., 1998: Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut.*, **42**, 470–476.

Niu, G.; Chen, X., 2010: Apoptosis Imaging: Beyond Annexin V. *Journal of Nuclear Medicine.*, **51**, 1659–1662.

Obstoy, B.; Salaun, M.; Veresezan, L.; Sesboüé, R.; Bohn, P.; Boland, F. X.; Thiberville, L., 2015: Safety and performance analysis of acriflavine and methylene blue for in vivo imaging of precancerous lesions using fibered confocal fluorescence microscopy (FCFM): an experimental study. *BMC Pulmonary Medicine.*, **15**, 30.

Osier, N. D.; Pham, L.; Savarese, A.; Sayles, K.; Alexander, S. A., 2016: Animal Models in Genomic Research: Techniques, Applications, and Roles for Nurses. *Applied nursing research : ANR.*, **32**, 247–256.

Owens, E. A.; Henary, M.; El Fakhri, G.; Choi, H. S., 2016: Tissue-Specific Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Accounts of chemical research.*, **49**, 1731–1740.

Ozaki, M.; Haga, S.; Ozawa, T., 2012: In Vivo Monitoring of Liver Damage Using Caspase-3 Probe. *Theranostics.*, **2**, 207–214.

Pantzar, N.; Weström, B. R.; Luts, A.; Lundin, S., 1993: Regional small-intestinal permeability in vitro to different-sized dextrans and proteins in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.*, **28**, 205–211.

Pao, W.; Girard, N., 2011: New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology.*, **12**, 175–180.

Papadakos, P. J.; Lachmann, B., 2008: *Mechanical Ventilation Clinical Applications and Pathophysiology* 1 edition. Elsevier.

Papaliagkas, V.; Anogianaki, A.; Anogianakis, G.; Ilonidis, G., 2007: The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. *Hippokratia.*, **11**, 108–113.

Papazian, L.; Thomas, P.; Bregeon, F.; Garbe, L.; Zandotti, C.; Saux, P.; Gaillat, F.; Drancourt, M.; Auffray, J. P.; Gouin, F., 1998: Open-lung Biopsy in Patients with Acute

Respiratory Distress Syndrome. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists.*, **88**, 935–944.

Penet, M. F.; Chen, Z.; Kakkad, S.; Pomper, M. G.; Bhujwala, Z. M., 2012: Theranostic imaging of cancer. *European journal of radiology.*, **81**, S124.

Peng, L.; Feng, L.; Yuan, H.; Benhabbour, S. R.; Mumper, R. J., 2014: Development of a Novel Orthotopic Non-small Cell Lung Cancer Model and Therapeutic Benefit of 2'-(2-bromohexadecanoyl)-Docetaxel Conjugate Nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine.*, **10**, 1497–1506.

Peng, M.; Liang, T. G.; Anantham, D., 2016: Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy of the Lungs. *Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine.*, **6**.

Perez, J. R.; Ybarra, N.; Chagnon, F.; Serban, M.; Lee, S.; Seuntjens, J.; Lesur, O.; El Naqa, I., 2017: Tracking of Mesenchymal Stem Cells with Fluorescence Endomicroscopy Imaging in Radiotherapy-Induced Lung Injury. *Scientific Reports.*, **7**.

Pham, C. T. N., 2008: Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *The international journal of biochemistry & cell biology.*, **40**, 1317–1333.

Phelps, M. E., 2000: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **97**, 9226–9233.

Popper, H. H., 2016: Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Reviews.*, **35**, 75–91.

Poręba, M.; Stróżyk, A.; Salvesen, G. S.; Drag, M., 2013: Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*, **5**.

Purandare, N. C.; Venkatesh, R.; Rangarajan, 2015: Imaging of lung cancer: Implications on staging and management. *The Indian journal of radiology & imaging.*, **25**, 109–120.

Rafael, D.; Gener, P.; Andrade, F.; Seras-Franzoso, J.; Montero, S.; Fernández, Y.; Hidalgo, M.; Arango, D.; Sayós, J.; Florindo, H. F.; Abasolo, I.; Jr, S. S.; Videira, M., 2018: AKT2 siRNA delivery with amphiphilic-based polymeric micelles show efficacy against cancer stem cells. *Drug Delivery.*, **25**, 961–972.

Rastogi, V.; Sharma, R.; Ranjan Misra, S.; Sharma, V., 2014: Emperipolesis – A Review. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH.*, **8**, ZM01–ZM02.

Rosenblatt, M. B., 1964: LUNG CANCER IN THE 19TH CENTURY. *Bulletin of the History of Medicine.*, **38**, 395–425.

Rozycki, H. J.; Hendricks-Muñoz, K. D., 2017: 81 - Structure and Development of Alveolar Epithelial Cells. In: Polin, R. A., S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz & W. W. Fox (eds.), *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. Elsevier, pp. 809–813.

Ruiz, P.; Maldonado, P.; Hidalgo, Y.; Gleisner, A.; Sauma, D.; Silva, C.; Saez, J. J.; Nuñez, S.; Rosemblatt, M.; Bono, M. R., 2013: Transplant Tolerance: New Insights and Strategies for Long-Term Allograft Acceptance. *Journal of Immunology Research*. Research article, .

Sabroe, I.; Prince, L. R.; Jones, E. C.; Horsburgh, M. J.; Foster, S. J.; Vogel, S. N.; Dower, S. K.; Whyte, M. K. B., 2003: Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).*, **170**, 5268–5275.

Saha, D.; Watkins, L.; Yin, Y.; Thorpe, P.; Story, M. D.; Song, K.; Raghavan, P.; Timmerman, R.; Chen, B.; Minna, J. D.; Solberg, T. D., 2010: An Orthotopic Lung Tumor Model for Image-Guided Microirradiation in Rats. *Radiation Research.*, **174**, 62–71.

Sahoo, M.; Ceballos-Olvera, I.; del Barrio, L.; Re, F., 2011: Role of the Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections. *The Scientific World Journal.*, **11**, 2037–2050.

Sarkar, I.; Mishra, A. K., 2018: Fluorophore tagged bio-molecules and their applications: A brief review. *Applied Spectroscopy Reviews.*, **53**, 552–601.

Savitskaya, M. A.; Onishchenko, G. E., 2015: Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow).*, **80**, 1393–1405.

Scabini, M.; Stellari, F.; Cappella, P.; Rizzitano, S.; Texido, G.; Pesenti, E., 2011: In vivo imaging of early stage apoptosis by measuring real-time caspase-3/7 activation. *Apoptosis: An International Journal On Programmed Cell Death.*, **16**, 198–207.

Scherer, P. M.; Chen, D. L., 2016: Imaging Pulmonary Inflammation. *Journal of Nuclear Medicine.*, **57**, 1764–1770.

Shakeri, R.; Kheirollahi, A.; Davoodi, J., 2017: Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.*, **135**, 111–125.

Shepherd, J.; Hilderbrand, S. A.; Waterman, P.; Heinecke, J. W.; Weissleder, R.; Libby, P., 2007: A novel fluorescent probe for the detection of myeloperoxidase activity in atherosclerosis-associated macrophages. *Chemistry & biology.*, **14**, 1221–1231.

Shultz, L. D.; Lyons, B. L.; Burzenski, L. M.; Gott, B.; Chen, X.; Chaleff, S.; Kotb, M.; Gillies, S. D.; King, M.; Mangada, J.; Greiner, D. L.; Handgretinger, R., 2005: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).*, **174**, 6477–6489.

Soboleski, M. R.; Oaks, J.; Halford, W. P., 2005: Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *The FASEB Journal.*, **19**, 440–442.
Solomon, B. J.; Mok, T.; Kim, D. W.; Wu, Y. L.; Nakagawa, K.; Mekhail, T.; Felip, E.; Cappuzzo, F.; Paolini, J.; Usari, T.; Iyer, S.; Reisman, A.; Wilner, K. D.; Tursi, J.; Blackhall, F.; PROFILE 1014 Investigators, 2014: First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England Journal of Medicine.*, **371**, 2167–2177.

Srinivasula, S. M.; Hegde, R.; Saleh, A.; Datta, P.; Shiozaki, E.; Chai, J.; Lee, R. A.; Robbins, P. D.; Fernandes-Alnemri, T.; Shi, Y.; Alnemri, E. S., 2001: A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature.*, **410**, 112–116.

Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S., 1997: Biochemical characteristics of caspases-3,-6,-7, and-8. *Journal of Biological Chemistry.*, **272**, 25719–25723.

Streba, C. T.; Gîltan, A. M.; Gheonea, I. A.; Demetrian, A.; Șoimu, A. V.; Săftoiu, A.; Gruionu, G.; Gruionu, L. G., 2016: Utility of confocal laser endomicroscopy in pulmonology and lung cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie.*, **57**, 1221–1227.

Strieter, R. M., 2008: What Differentiates Normal Lung Repair and Fibrosis?: Inflammation, Resolution of Repair, and Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society.*, **5**, 305–310.

Sui, H.; Ma, N.; Wang, Y.; Li, H.; Liu, X.; Su, Y.; Yang, J., 2018: Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies. *Journal Of Immunology Research.*, **2018**.

Suzuki, Y.; Nakabayashi, Y.; Nakata, K.; Reed, J. C.; Takahashi, R., 2001: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Inhibits Caspase-3 and -7 in Distinct Modes. *Journal of Biological Chemistry.*, **276**, 27058–27063.

Swiecicki, J. M.; Thiebaut, F.; Di Pisa, M.; Gourdin -Bertin, S.; Tailhades, J.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Chwetzoff, S.; Trugnan, G.; Chassaing, G.; Lavielle, S., 2016: How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides. *Scientific Reports.*, **6**.

S. Wolfbeis, O., 2015: An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews.*, **44**, 4743–4768.

Szadvari, I.; Krizanova, O.; Babula, P., 2016: Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment, **65**, 13.

Szerkus, O.; Yumba Mpanga, A.; J Markusewski, M.; Kaliszan, R.; Siluk, D., 2016: Optimization of the Electrospray Ionization Source with the Use of the Design of Experiments Approach for the LC–MS-MS Determination of Selected Metabolites in Human Urine. *Spectroscopy.*, **14**, 8–16.

Talanian, R. V.; Quinlan, C.; Trautz, S.; Hackett, M. C.; Mankovich, J. A.; Banach, D.; Ghayur, T.; Brady, K. D.; Wong, W. W., 1997: Substrate specificities of caspase family proteases. *Journal of Biological Chemistry.*, **272**, 9677–9682.

Thiberville, L.; Salaün, M.; Lachkar, S.; Dominique, S.; Moreno-Swirc, S.; Vever-Bizet, C.; Bourg-Heckly, G., 2009a: Confocal Fluorescence Endomicroscopy of the Human Airways. *Proceedings of the American Thoracic Society.*, **6**, 444–449.

Thiberville, L.; Salaün, M.; Lachkar, S.; Dominique, S.; Moreno-Swirc, S.; Vever-Bizet, C.; Bourg-Heckly, G., 2009b: Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *The European Respiratory Journal.*, **33**, 974–985.

Timmons, A. K.; Mondragon, A. A.; Meehan, T. L.; McCall, K., 2016: Control of non-apoptotic nurse cell death by engulfment genes in *Drosophila*. *Fly.*, **11**, 104–111.

Tipirneni, K. E.; Rosenthal, E. L.; Moore, L. S.; Haskins, A. D.; Udayakumar, N.; Jani, A. H.; Carroll, W. R.; Morlandt, A. B.; Bogyo, M.; Rao, J.; Warram, J. M., 2017: Fluorescence Imaging for Cancer Screening and Surveillance. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging.*, **19**, 645–655.

Tomashefski, J. F., 2000: Pulmonary Pathology Of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clinics in Chest Medicine.*, **21**, 435–466.

Travis, W. D.; Brambilla, E.; Riely, G. J., 2013: New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.*, **31**, 992–1001.

Uhlig, S.; Yang, Y.; Waade, J.; Wittenberg, C.; Babendreyer, A.; Kuebler, W. M., 2014: Differential Regulation of Lung Endothelial Permeability in Vitro and in Situ. *Cellular Physiology and Biochemistry*., **34**, 1–19.

Umbrello, M.; Formenti, P.; Bolgiaghi, L.; Chiumello, D., 2016: Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*., **18**, 64.

Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., 2012: Characteristics of Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 53–74.

van den Berg, E.; Bal, S. M.; Kuipers, M. T.; Matute-Bello, G.; Lutter, R.; Bos, A. P.; van Woensel, J. B. M.; Bem, R. A., 2015: The caspase inhibitor zVAD increases lung inflammation in pneumovirus infection in mice. *Physiological Reports*., **3**.

Vansteenkiste, J. F.; Stroobants, S. G., 2001: The role of positron emission tomography with 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose in respiratory oncology. *European Respiratory Journal*., **17**, 802–820.

Vercauteren, T., 2008: *Image registration and mosaicing for dynamic in vivo fibered confocal microscopy*. École Nationale Supérieure des Mines de Paris.

Verdoes, M.; Bender, K. O.; Segal, E.; van der Linden, W. A.; Syed, S.; Withana, N. P.; Sanman, L. E.; Bogyo, M., 2013: An improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity. *Journal of the American Chemical Society*., **135**.

Vernooy, J. H. J.; Dentener, M. A.; van Suylen, R. J.; Buurman, W. A.; Wouters, E. F. M., 2001: Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in Mice Induces Apoptosis in Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*., **24**, 569–576.

Vivès, E.; Richard, J. P.; Rispal, C.; Lebleu, B., 2003: TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry. *Current Protein & Peptide Science*., **4**, 125–132.

Vorobjev, I. A.; Barteneva, N. S., 2017: Multi-parametric imaging of cell heterogeneity in apoptosis analysis. *Methods*., Flow Cytometry, **112**, 105–123.

Wachmann, K.; Pop, C.; van Raam, B. J.; Drag, M.; Mace, P. D.; Snipas, S. J.; Zmasek, C.; Schwarzenbacher, R.; Salvesen, G. S.; Riedl, S. J., 2010: Activation and Specificity of human Caspase-10. *Biochemistry*., **49**, 8307–8315.

- Walsh, J. G.; Cullen, S. P.; Sheridan, C.; Lüthi, A. U.; Gerner, C.; Martin, S. J., 2008: Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **105**, 12815–12819.
- Wang, T. D., 2005: Confocal microscopy from the bench to the bedside. *Gastrointestinal Endoscopy.*, **62**, 696–697.
- Wang, Y.; Tjandra, N., 2013: Structural Insights of tBid, the Caspase-8-activated Bid, and Its BH3 Domain. *The Journal of Biological Chemistry.*, **288**, 35840–35851.
- Watson, P.; Jones, A. T.; Stephens, D. J., 2005: Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **57**, 43–61.
- Wengrowski, A. M.; Kuzmiak-Glancy, S.; Jaimes, R.; Kay, M. W., 2014: NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.*, **306**, H529–H537.
- Wijmans, L.; Bonta, P. I.; Rocha-Pinto, R.; de Bruin, D. M.; Brinkman, P.; Jonkers, R. E.; Roelofs, J. J. T. H.; Poletti, V.; Hetzel, J.; Annema, J. T., 2019: Confocal Laser Endomicroscopy as a Guidance Tool for Transbronchial Lung Cryobiopsies in Interstitial Lung Disorder. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases.*, **97**, 259–263.
- Wong, A. K.; Walkey, A. J., 2015: Open Lung Biopsy among Critically Ill, Mechanically Ventilated Patients: A Meta-Analysis. *Annals of the American Thoracic Society.*, **12**, 1226–1230.
- Wu, K.; Liu, J. J.; Adams, W.; Sonn, G. A.; Mach, K. E.; Pan, Y.; Beck, A. H.; Jensen, K. C.; Liao, J. C., 2011: Dynamic Real-time Microscopy of the Urinary Tract Using Confocal Laser Endomicroscopy. *Urology.*, **78**, 225–231.
- Yamada, T.; Takatsu, Y.; Kasumi, M.; Ichimura, K.; van Doorn, W. G., 2006: Nuclear fragmentation and DNA degradation during programmed cell death in petals of morning glory (*Ipomoea nil*). *Planta.*, **224**, 1279–1290.
- Yamamoto, S.; Korn, R. L.; Oklu, R.; Migdal, C.; Gotway, M. B.; Weiss, G. J.; Iafrate, A. J.; Kim, D. W.; Kuo, M. D., 2014: ALK molecular phenotype in non-small cell lung cancer: CT radiogenomic characterization. *Radiology.*, **272**, 568–576.
- Yogo, T.; Umezawa, K.; Kamiya, M.; Hino, R.; Urano, Y., 2017: Development of an Activatable Fluorescent Probe for Prostate Cancer Imaging. *Bioconjugate Chemistry.*, **28**, 2069–2076.

Yu, W.; He, L. R.; Zhao, Y. C.; Chan, M. H.; Zhang, M.; He, M., 2013: Dynamic protein-protein interaction subnetworks of lung cancer in cases with smoking history. *Chinese Journal of Cancer.*, **32**, 84–90.

Yuan, J.; Kroemer, G., 2010: Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development.*, **24**, 2592–2602.

Zaric, B.; Stojisic, V.; Sarcev, T.; Stojanovic, G.; Carapic, V.; Perin, B.; Zarogoulidis, P.; Darwiche, K.; Tsakiridis, K.; Karapantzos, I.; Kesisis, G.; Kougioumtzi, I.; Katsikogiannis, N.; Machairiotis, N.; Stylianaki, A.; Foroulis, C. N.; Zarogoulidis, K., 2013: Advanced bronchoscopic techniques in diagnosis and staging of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease.*, **5**, S359–S370.

Z'graggen, B. R.; Tornic, J.; Müller-Edenborn, B.; Reyes, L.; Booy, C.; Beck-Schimmer, B., 2010: Acute lung injury: apoptosis in effector and target cells of the upper and lower airway compartment. *Clinical and Experimental Immunology.*, **161**, 324–331.

Zhegalova, N. G.; He, S.; Zhou, H.; Kim, D. M.; Berezin, M. Y., 2014: Minimization of self-quenching fluorescence on dyes conjugated to biomolecules with multiple labeling sites via asymmetrically charged NIR fluorophores. *Contrast media & molecular imaging.*, **9**, 355–362.

Zhou, M.; Li, Y.; Hu, Q.; Bai, X. chen; Huang, W.; Yan, C.; Scheres, S. H. W.; Shi, Y., 2015: Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & Development.*, **29**, 2349–2361.

Zhou, S.; Lin, J.; Du, W.; Zhang, Z.; Luo, Q.; Liu, B. F.; Dai, Y., 2006: Monitoring of proteinase activation in cell apoptosis by capillary electrophoresis with bioengineered fluorescent probe. *Analytica Chimica Acta.*, **569**, 176–181.

Ziegler, A.; Nervi, P.; Dürrenberger, M.; Seelig, J., 2005: The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry.*, **44**, 138–148.

Ziegler, U.; Groscurth, P., 2004: Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society.*, **19**, 124–128.

Zinn, K. R.; Chaudhuri, T. R.; Szafran, A. A.; O'Quinn, D.; Weaver, C.; Dugger, K.; Lamar, D.; Kesterson, R. A.; Wang, X.; Frank, S. J., 2008: Noninvasive Bioluminescence Imaging in Small Animals. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources.*, **49**, 103–115.

ANNEXES

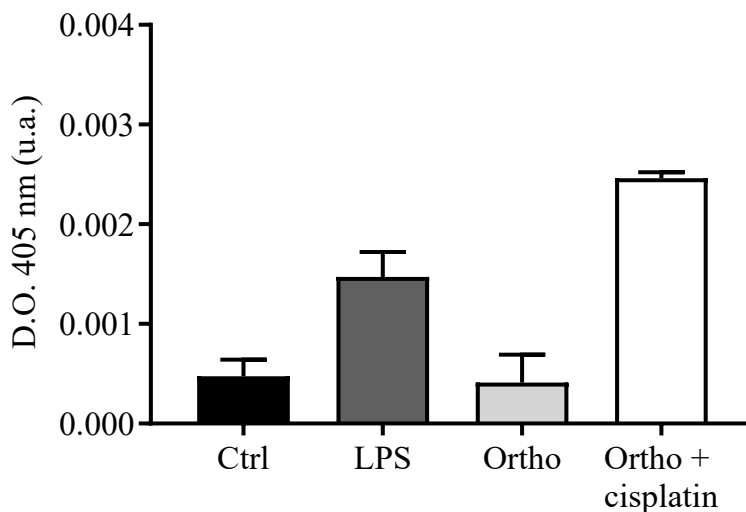


Figure 42 : Activité de la caspase 3 dans le poumon de différents modèles de rat

Expérience réalisée par Frédéric Chagnon du laboratoire de Pr Olivier Lesur où l'activité de la caspase 3 a été mesurée dans des lysats de poumons de rats contrôle (Ctrl, n = 6), traités au LPS (LPS, n = 4), implanté avec les cellules A549-GFP (Ortho, n = 2) et traités au cisplatine (Ortho + cisplatin, n = 2). Suite à l'imagerie par MECEF, les poumons de rats des différents modèles ont été prélevés et lysés. L'activité de la caspase 3 a été dosée dans 100 µg de protéine. Le lysat a incubé 2 h avec l'Ac-DEVD-pNa avant de lire la D.O. à 405 nm. Il y a une activité de la caspase 3 plus élevée chez les modèles LPS et le modèle Ortho + cisplatin. Cette activité est sensiblement la même entre le modèle Ortho et le Ctrl.